

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**E.A.P. DE GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA**

**Colonización intraluminar testicular de células madres  
germinales a partir de células madre pluripotentes  
obtenidas de la masa celular interna en ratones**

**TESIS**

para optar al título profesional de Biólogo Genetista Biotecnólogo

**AUTOR**

Láyonel Germán Acosta Campos

**ASESOR**

José Luis Pino Gaviño

**Lima – Perú**

**2010**



**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**  
**(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE**  
**BIÓLOGO GENETISTA BIOTECNÓLOGO**  
**(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN DE TESIS)**

Siendo las..... horas del 17 de septiembre de 2010, en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas y en presencia del jurado formado por los profesores que suscriben, se dio inicio a la sesión para optar al **Título Profesional de Biólogo Genetista Biotecnólogo** de **LÁYONAL GERMÁN ACOSTA CAMPOS**.

Luego de dar lectura y conformidad al **expediente N° 002-EAPGB-10**, el titulando expuso su tesis: **“COLONIZACIÓN INTRALUMINAR TESTICULAR DE CÉLULAS MADRES GERMINALES A PARTIR DE CÉLULAS MADRE PLURIPOTENTES OBTENIDAS DE LA MASA CELULAR INTERNA EN RATONES”**, y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota ..... , calificativo:

Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Académico Profesional de Genética y Biotecnología, y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el **Título Profesional de Biólogo Genetista Biotecnólogo** a **LÁYONAL GERMÁN ACOSTA CAMPOS** y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título, conforme a ley.

Siendo las..... horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 17 de septiembre de 2010.

---

**Mg. FERNANDO RETUERTO P.**  
**(PRESIDENTE)**

---

**Blgo. JOSÉ PINO G.**  
**(ASESOR)**

---

**Blga. ELENA ARBAIZA P.**  
**(MIEMBRO)**

---

**Blga. BETTY SHIGA O.**  
**(MIEMBRO)**



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS  
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA

**COLONIZACIÓN INTRALUMINAR TESTICULAR DE CÉLULAS  
MADRES GERMINALES A PARTIR DE CÉLULAS MADRE  
PLURIPOTENTES OBTENIDAS DE LA MASA CELULAR  
INTERNA EN RATONES**

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE BIÓLOGO GENETISTA  
BIOTECNÓLOGO

**BACH. ACOSTA CAMPOS LÁYONAL GERMÁN**

ASESOR: JOSÉ LUIS PINO GAVIÑO

**LIMA – PERÚ**

**2010**

## DEDICATORIA

A mis padres, Hipólito y Elizabeth,  
que me dieron la vida y han estado  
conmigo en todo momento, por su  
amor, comprensión y entrega.

A mis queridos hermanos, Marco Polo,  
Germán y Jonathan, por su amistad,  
apoyo, compañía y amor.

A mi esposa e hijo, Esther y Lionel, que son  
las luces de mi camino, los que día a día me  
brindan un amor puro y maravilloso; por ser la  
razón de mi vivir.

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer a mis padres, por educarme, enseñarme, amarme y por el apoyo en el desarrollo de esta tesis. A mis hermanos, por confiar en mí, por su cariño y amistad. A mis abuelos, tíos, primos que siempre estuvieron conmigo demostrándome su cariño y apoyo. A mi esposa e hijo por brindarme su amor, comprensión y paciencia.

Un agradecimiento muy especial a Victor Nuñez Silvestre, por su amistad, dedicación incondicional y por su sincero y desinteresado apoyo en la elaboración de esta tesis, por ser la persona que me acompañó en las buenas y en los estresantes momentos; por sus conocimientos y estudio constante para el mejoramiento y desarrollo de la misma. Muchas Gracias Amigo.

A mis amigos y compañeros del Laboratorio de Reproducción y Biología del Desarrollo; Arturo, Rafael, Jonathan, Rosmary, Karito y Pilar por su apoyo desinteresado.

A Ricardo Pella y Katya Zumaeta del Instituto Peruano de Biología Molecular (IPBM), por permitirme desarrollar parte de la investigación en sus instalaciones, por su asesoramiento y por todo el apoyo brindado.

Al Consejo Superior de Investigación (CSI) de la UNMSM y a la Facultad de Ciencias Biológicas por el financiamiento para la elaboración de la tesis.

A los profesores Misael Guevara y Olga Bracamonte por sus consejos, por ser como unos padres y tutores durante mi preparación universitaria.

A los Profesores Fernando Retuerto y Elena Arbaiza, por su valiosa colaboración en la revisión crítica del proyecto de Tesis para poder obtener el financiamiento del CSI.

A los profesores Betty Shiga, Erasmo Colona y Margarita Velásquez por su desinteresado apoyo en el desarrollo de la tesis.

Al Profesor José Luis Pino Gaviño, por aceptar ser mi asesor, por ser como un padre y a la vez un amigo, por enseñarme, brindarme sus conocimientos, y apoyo constante en la elaboración de la tesis.

## ABREVIATURAS

- aFGF : Acidic Fibroblast Growth Factor
- Blimp 1 : B – lymphocyte-induced maturation protein 1
- Bmp4 : Bone morphogenetic protein 4
- Bmp8b : Bone morphogenetic protein 8b
- CE : Cuerpos Embrionarios
- c-kit : Receptor tirosina - cinasa
- CME : Células Madre Embrionarias
- CMG : Células Madre Germinales
- CP : Ciclofosfamida
- DAZL : Deleted in Azoospermia Like
- Dmc1 : DMC1 dosage suppressor of mck1 homolog, meiosis-specific  
Homologous recombination (yeast)
- dpc : Días post concepción
- Dppa3 : Developmental pluripotency-associated protein 3
- Eras : ES cell- expressed Ras
- Fgf8 : Fibroblast growth factor 8
- HGF : Hepatocyte Growth Factor
- Ifitm3 : Interferon-induced transmembrane protein 3
- IGF -1 : Insulin-like Growth Factor-1
- MCI : Masa Celular Interna
- mvh : Mouse vasa-homolog
- Oct4 : Octamer - 4
- pc : Peso corporal

- Piwil2 : P- element-induced wimpy testis like-2
- Pou5f1 : POU domain, class 5, transcription factor 1
- Prma1 : Protamine 1
- Rnh2 : Ribonuclease inhibitor-2
- SSEA1 : Stage- Specific Embryonic Antigen-1
- SFC : Factor Stem Cell
- Stra8 : Stimulated by retinoic acid gene 8
- Sycp3 : Synaptonemal complex protein 3
- Tdrd1 : Tudor domain containing protein-1
- Tex14 : Testis- expressed gene 14
- TNAP : Fosfatasa alcalina tejido no-específico
- TSH : Thyroid Stimulating Hormone



## INDICE

### RESUMEN

### ABSTRACT

<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1 - 3</b>
<b>II. ANTECEDENTES</b>	<b>4 – 21</b>
1. Desarrollo embrionario temprano	4
2. Células Madre o Stem Cell	5
3. Células Madre Pluripotentes	6
4. Aislamiento de Células Madre Pluripotentes	8
5. Células Germinales Primordiales (CGPs)	9
6. Similitud entre Células Madre Pluripotentes o embrionarias y Células Germinales Primordiales	13
7. Diferenciación de las CME en CGPs	14
8. Espermatogénesis en Ratones	16
9. Efecto de la Ciclofosfamida (CP) en la Reproducción Masculina	18
10. Inmunocirugía: Aislamiento de la MCI de los blastocistos	20
11. Transplante de Células Madre	21

<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>22 – 34</b>
<b>1. MATERIALES</b>	<b>22</b>
1.1. Material Biológico	22
1.1.1. Obtención de la MCI y efecto de la ciclofosfamida	22
1.1.2. Obtención de anticuerpos anti-bazo de ratón	22
1.2. Materiales de Laboratorio	24
1.2.1. Reactivos	24
1.2.2. Equipos	25
1.2.3. Instrumental	26
<b>2. MÉTODOS</b>	<b>27</b>
2.1. Tratamiento con Ciclofosfamida	27
2.2. Recuperación de Blastocisto	27
2.3. Obtención de anticuerpos de conejo anti-bazo de ratón y complemento de cobayo	29
2.4. Inmunocirugía	32
2.5. Microinyección de células madre en la rete testis	33
2.6. Análisis de Receptores	34

<b>IV. RESULTADOS</b>	<b>35 - 41</b>
1. Efecto de la ciclofosfamida: observación en la histología testicular	35
2. Recuperación de blastocistos e inmunocirugía	36
2.1. Recuperación de blastocistos	36
2.2. Inmunocirugía	37
3. Inyección a la rete testis	39
4. Análisis del trasplante de la MCI	39
<b>V. DISCUSIÓN</b>	<b>42 – 46</b>
<b>VI. CONCLUSIONES</b>	<b>47</b>
<b>VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>48 – 65</b>
<b>VIII. ANEXOS</b>	<b>66 - 69</b>

## RESUMEN

La terapia celular de células madre pluripotentes o embrionarias utilizada por la medicina regenerativa es un protocolo recientemente aplicado. Estas células, son derivadas de la masa celular interna (MCI) del estadio de blastocisto y son capaces de diferenciarse en todos los linajes celulares del cuerpo. Por otro lado, el tratamiento de enfermedades crónicas como el cáncer requiere de potentes fármacos que, en ocasiones, producen efectos no deseados. Ciclofosfamida (CP) es una droga anticancerígena alquilante que, entre otras cosas, provoca como efecto secundario infertilidad. El objetivo de la presente investigación fue revertir dicho efecto negativo, mediante terapia celular, utilizando células de la MCI al diferenciarse *in vivo* en células madre germinales (CMG). Se utilizaron blastocistos de ratones albinos *Swiss Rockefeller* obtenidos a las 90 h post cópula. La MCI fue aislada mediante inmunocirugía y luego trasplantada a los túbulos seminíferos de ratones receptores C57BL, a los que previamente se les disminuyó drásticamente la línea germinal con CP (220mg/kg pc). Los animales receptores fueron mantenidos por 35 días en un bioterio en condición estándar; luego los animales fueron sacrificados por dislocación cervical, se extrajeron los testículos para evidenciar la colonización y diferenciación de la MCI mediante cortes histológicos seriados. La evaluación comprobó colonización intraluminal y presencia de minitúbulos (2%) en el 62.5% de los receptores transplantados. Se demostró que las células de la MCI tienen la capacidad de colonizar túbulos seminíferos de ratones adultos de diferentes cepas.

**PALABRAS CLAVES:** Colonización intraluminal, Masa Celular interna, Células Madre Pluripotentes, Células Madre Germinales, Minitúbulos.

## ABSTRACT

Cellular therapy with embryonic or pluripotent stem cells used by regenerative medicine is a newly implemented protocol. These cells are derived from the blastocyst stage inner cell mass (ICM) and are capable of differentiating into all the body cell lineages. On the other hand, chronic diseases treatment such as cancer requires powerful drugs that sometimes cause unwanted effects. Cyclophosphamide (CP) is an alkylating anticancer drug that, among other things, causes infertility as a side effect. The aim of this research was reverse this negative effect by cell therapy using ICM to differentiate *in vivo* to germ stem cell (GSC). *Swiss Rockefeller* albino mice blastocyst stage embryos obtained 90 hours *post coitus* were used. The MCI was isolated by immunosurgery and then transplanted to the seminiferous tubules of recipient mice C57BL, which were previously germ line decreased drastically with CP (220mg/kg pc). The recipient animals were kept for 35 days in standard animal room conditions, after the animals were sacrificed by cervical dislocation; testes were removed to show the ICM colonization and differentiation by serial histological sections. The evaluation found the intraluminal colonization and presence of minitubules (2%) in the transplant recipients (62.5%). It is shown that the ICM cells have the ability to colonize seminiferous tubules of adult mice of different strains.

**KEY WORDS:** Intraluminal Colonization, Inner Cell Mass, Pluripotent Stem Cells, Germ Stem Cells, Minitúbules.

## I. INTRODUCCIÓN

La Terapia celular es una nueva herramienta para la medicina regenerativa, que hoy en día tiene su base en el uso de células madre. Célula madre o stem cell se define como una célula progenitora, autorrenovable, capaz de regenerar uno o más tipos celulares diferenciados. Las células madres tienen la capacidad de llegar a convertirse en cualquiera de los más de 200 tipos de células diferentes en el cuerpo y juegan un importante rol en reparar órganos y tejidos (Johnson y Williams, 2006).

Las células madre pluripotentes o embrionarias son las que derivan de la masa celular interna (MCI) y que pueden ser expandidas sin límite *in vitro* (Evans y Kaufman, 1981; Martin, 1981; Thomson *et al.*, 1998). Las células madre embrionaria derivan de embriones en un estado de desarrollo antes del tiempo de la implantación en el útero (etapa de blastocisto), cuando se encuentran 2 tipos de líneas celulares, una va a convertirse en parte de la placenta (el trofoectodermo) y otra en la masa celular interna (MCI). La MCI tiene la capacidad de generar cualquier tipo celular del cuerpo. Si la MCI es removida de su ambiente normal embrionario y cultivado bajo condiciones apropiadas, las células derivadas de éstas, pueden continuar la proliferación y replicación indefinidamente y seguir manteniendo su capacidad de formar cualquier tipo celular del cuerpo, llamado esto “pluripotencia”. La derivación de células madre embrionaria de ratón fue reportado por primera vez por Evans y Kaufman (1981). Las células madre de la línea germinal (CMG) están dedicadas a la función de la reproducción; estas tienen la capacidad de autorrenovarse y diferenciarse en gametos, son las únicas células dedicadas sólo a la transmisión de información genética de generación en generación.

En investigaciones recientes se ha demostrado que los gametos masculinos y femeninos pueden diferenciarse *in vitro* (Hubner *et al.*, 2003; Toyooka *et al.*, 2003; Geijsen *et al.*, 2004; Lacham – Kaplan *et al.*, 2006; Nayernia *et al.*, 2006). También se ha mostrado en ratón que las células madres embrionarias (CME) pueden diferenciarse a células madres espermatogoniales usando un promotor y estas son capaces de generar gametos haploides masculinos *in vitro* y son funcionales durante 72 horas (Nayernia *et al.*, 2007). Se ha podido demostrar que las células madres somáticas adultas pueden llegar a generar CMG, pero no tienen la capacidad de entrar a meiosis (Nayernia *et al.*, 2007).

La Ciclofosfamida (CP) es un fármaco utilizado en quimioterapia contra distintos tipos de cáncer. Sus células diana son aquellas que se encuentra en división, causando daño directo, entre otras líneas celulares, a los túbulos seminíferos, generando apoptosis celular en la línea espermática (Crook *et al.*, 1986; Chowdhury, 1987; Brinkworth y Nieschlag, 2000). En el testículo interrumpe la meiosis antes de la etapa de paquiteno, produciendo un daño genotóxico.

La técnica de trasplante de células madre a nivel de testículo fue descrita por primera vez por Brinster y Avarbock (1994), en la cual utilizaron CMG y ratones inmunocompatibles. El proceso básico consiste en recolectar células madre de un animal donador e inyectarlas en los túbulos seminíferos del animal receptor, con el objetivo que las células madre donador colonicen la membrana basal de los túbulos en busca del nicho donde se desarrollen las células madre y se diferencien para que puedan realizar la espermatogénesis en los testículos del animal receptor.

Cabe resaltar que no existe en la literatura, trabajos previos de colonización intraluminal a partir del trasplante de MCI en ratones. Por ello en el presente trabajo de tesis se

evaluará la existencia de una colonización; una diferenciación de MCI y la recuperación del epitelio seminífero dañado por la CP, para ello utilizamos los embriones (blastocistos) obtenidos de la cepa Swiss Rockefeller, se extrae la MCI mediante la técnica de inmunocirugía y la trasplantamos en los túbulos seminíferos de ratón de la cepa C57BL que han sido tratados previamente con CP. Esta evaluación se determinará realizando cortes histológicos de 5  $\mu$ m de espesor, coloreados con hematoxilina y eosina Y. La presencia de una colonización intraluminal, nos sugiere la formación de minitúbulos.

La reproducción y la fertilidad son la base de la continuidad de las especies. Los problemas de infertilidad nos pueden llevar a problemas psicosociales en las parejas humanas. Aunque el tratamiento con terapia celular, no es tan reciente, si lo es el uso de células madre en este campo, ya que pueden ser diferenciadas a cualquier tejido del cuerpo, o como en este caso, a células germinales. Además, demostrar la recuperación del epitelio seminífero afectado debido al uso de un fármaco usado frecuentemente en el tratamiento de cáncer y, considerando el alto número de pacientes varones con este mal, nos motiva a buscar la solución a este problema mediante el uso de la biotecnología animal, basado en el cultivo y trasplante de las células madre y teniendo como modelo al ratón.



## II. ANTECEDENTES

### 1. DESARROLLO EMBRIONARIO TEMPRANO

El linaje de segregación en el embrión de ratón se inicia en las etapas de divisiones tempranas cuando el primer blastómero dividido se encuentra destinado a formar predominantemente la estructura embrionaria (Piotrowska *et al.*, 2001). Esta restricción es reforzada en la mórula compactada de 8 células a los 2.5 dpc, con células interiores que formaran la MCI y blastómeras segregadas sobre la superficie externa que formarán el trofoblasto (Johnson y Ziomek, 1981). Cuando el embrión se encuentra aproximadamente en 32 células (3.5 dpc), se empieza a formar el blastocelo para formar y diferenciar a la MCI. En la etapa de mórula-blastocisto la mayoría de ADN se encuentra no metilado, llegando a re-metilarse con la diferenciación de las líneas somáticas en la gastrulación (Jaenisch, 1997). A los 4 dpc, las células de la MCI en contacto con el blastocelo llega a formar el endodermo primitivo (o hipoblasto) y en el interior aproximadamente 20 células pluripotentes permanecen como MCI no polarizado (Handyside, 1978). En la implantación a los 5 dpc, se forma una cavidad pro-amniótica dentro del núcleo de aproximadamente 20 – 25 células de la MCI, el cual empieza a organizarse como una lámina epitelial. El endodermo primitivo se diferencia a endodermo visceral, el cual permanece en contacto con el embrión hasta la gastrulación, cuando es reemplazado por el endodermo embrionario y el endodermo visceral desplazado forma el saco vitelino visceral. El endodermo primitivo en contacto con el trofoectodermo migra lateralmente a la línea del blastocelo formando el endodermo parietal y finalmente el endodermo del saco vitelino. La proliferación del embrión en el blastocelo produce un huevo cilíndrico a los 6 dpc, el cual es compuesto de 2 láminas epiteliales, el ectodermo primitivo y capa subyacente de

endodermo visceral. A los 6.5 dpc la gastrulación inicia en la región posterior del embrión formando el mesodermo extraembrionario y las capas germinales: mesodermo, endodermo y ectodermo (O'Shea, 2004).

## 2. CÉLULAS MADRE O STEM CELL

Célula madre o stem cell se define como células indiferenciadas, inmaduras, autorrenovables y capaces de generar uno o más tipos de células diferenciadas. En las condiciones adecuadas, estas células pueden dividirse indefinidamente conservando siempre una población estable de células madre y recibiendo estímulos adecuados pueden diferenciarse hacia diferentes tipos de células especializadas de un organismo adulto (Evans y Kaufman, 1981; Martin, 1981; Thomson *et al.*, 1998; Das *et al.*, 2008). Según su capacidad de regeneración existen 3 tipos de células madre: Células madre totipotentes, células madre pluripotentes y células madre multipotentes.

*Las células madre totipotentes* pueden crecer y formar un organismo completo, tanto los componentes embrionarios (como por ejemplo, las tres capas embrionarias, el linaje germinal y los tejidos que darán lugar al saco vitelino), como los extraembrionarios (como la placenta). *La células madre pluripotentes* no pueden formar un organismo completo, pero puede formar cualquier otro tipo de célula proveniente de los tres linajes embrionarios (endodermo, ectodermo y mesodermo), así como el germinal y el saco vitelino. *Las células madre multipotentes* son aquellas que solo pueden generar células de su propia capa o linaje embrionario de origen (por ejemplo: una célula madre mesenquimal de médula ósea, al tener naturaleza mesodérmica, dará origen a células de esa capa como miocitos, adipocitos u osteocitos entre otras).

### 3. CÉLULAS MADRE PLURIPOTENTES

Las CME son las células que se originan de la MCI de un embrión en el estado de blastocisto, esto es dependiendo la especie, 4 – 7 días después de la fecundación. Esta estructura particular surge como resultado de una serie de divisiones sucesivas de las células embrionarias (o blastómeras), las cuales se especializan para conformar una estructura hueca constituida por una capa externa de células denominada trofoectodermo, e interiormente por células en forma de racimo denominadas MCI. La capa externa de células continúa su desarrollo para formar la placenta y otros tejidos necesarios para la implantación y posterior desarrollo fetal del embrión en el útero, mientras que las células internas se desarrollan y especializan en los tejidos de las diferentes capas germinales del embrión, endodermo, mesodermo y ectodermo, formando así todos los tejidos de un organismo (Hooper, 1992). *Las CME se les denominan entonces pluripotentes*, ya que pueden generar todos los tipos celulares del cuerpo, pero no pueden dar origen a las células de la placenta (Arias y Felmer, 2009).

Los factores que mantienen la pluripotencia son expresados en mórulas compactadas, en la MCI del blastocisto y son regulados con la diferenciación de linajes en la gastrulación. Las CME (células madre pluripotentes) de ratón y su diferenciación a otras células ha sido ampliamente examinado *in vivo* e *in vitro* para entender el desarrollo biológico y la medicina regenerativa en ratón (Boheler *et al.*, 2002). El gran objetivo de la tecnología de las CME consiste en dirigir los cultivos de células indiferenciadas hacia la formación de tejidos y órganos para terapias de reemplazo celular (Rippon y Bishop, 2004). Las células utilizadas para estos propósitos terapéuticos deben ser seleccionadas por su estabilidad genética y normalidad, antes de iniciar la aplicación terapéutica en humanos. De esta forma, el principal desafío para la aplicación futura de las terapias de sustitución celular es

el control sobre la diferenciación de estas células hacia tejidos específicos. Es por tanto necesario desarrollar procedimientos que conduzcan eficazmente a la diferenciación de las células madre pluripotentes hacia los tipos específicos de células que se requieran en cada caso. La diferenciación *in vitro* de estas células se realiza removiendo del medio de cultivo los factores que las mantienen indiferenciadas y aplicando los estímulos apropiados necesarios para su diferenciación hacia las tres líneas germinales embrionarias (Keller, 1995; Smith, 2001). Cuando estas células son cultivadas en suspensión, en ausencia de factores antidiferenciación, forman agregados celulares tridimensionales llamados cuerpos embrionarios (CE), los que luego de 2 - 4 días en cultivo forman el endodermo, dando lugar a un cuerpo embrionario simple, el cual se diferencia al cuarto día generando una estructura más compleja con epitelio columnar y membrana basal (Leahy *et al.*, 1999). En esta etapa, los cuerpos embrionarios son llamados cuerpos embrionarios quísticos (Evans y Kaufman 1981; Keller *et al.*, 1993; Ng *et al.*, 2005).

En cultivo, la exposición a los estímulos y/o agentes químicos adecuados pueden inducir la diferenciación de estos cuerpos embrionarios hacia un linaje específico, por ejemplo el ácido retinoico para la diferenciación a células neuronales (Ezekiel *et al.*, 2007), aFGF y HGF, para diferenciación en células hepáticas (Hu *et al.*, 2003), TSH para la diferenciación en adipocitos (Lu y Lin, 2008) y en conjunto bFGF, IGF-1 y nicotinamida para su diferenciación en células semejantes a los islotes del páncreas, entre otros (Liu *et al.*, 2005; Liersch *et al.*, 2006).

Para determinar el potencial de diferenciación *in vivo*, las células madre pluripotentes o embrionarias de origen animal se agregan a embriones de ocho células o a embriones en la etapa de blastocisto para originar una quimera en la que posteriormente es necesario

establecer la contribución de estas células en la formación de la MCI y del trofoectodermo (Saito *et al.*, 2003) y en al menos un porcentaje no inferior al 10% en la formación de algún tejido en los animales nacidos (Stice *et al.*, 1996; Cibelli *et al.*, 1998).

#### **4. AISLAMIENTO DE CÉLULAS MADRE PLURIPOTENTES**

Las células madre embrionarias fueron aisladas por primera vez desde la masa celular interna de blastocistos de ratón en 1981 (Evans y Kaufman, 1981; Martin, 1981). Estos estudios preliminares fueron la base para que años más tarde se hayan logrado establecer líneas de células madre embrionarias a partir de otras especies como el hámster (Doetschman *et al.*, 1988), cerdo (Evans *et al.*, 1990), conejo (Graves y Moreadith, 1993), bisonte (Sukoyan *et al.*, 1993), rata (Iannaccone *et al.*, 1994), mono Rhesus (Thomson *et al.*, 1995), marmota (Thomson *et al.*, 1996), pollo (Pain *et al.*, 1996), bovino (Stice *et al.*, 1996; Cibelli *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2005), humano (Thomson *et al.*, 1998), perro (Hayes *et al.*, 2008) y gato (Yu *et al.*, 2008). Más recientemente, en pocas especies se han aislado líneas de células madre embrionarias a partir de embriones clonados, generados por fecundación *in vitro* y/o partenogénesis (Wakayama *et al.*, 2001; Cibelli *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2005; Byrne *et al.*, 2007; Mai *et al.*, 2007). Las CME de ratón y su diferenciación a otras células ha sido ampliamente examinado *in vivo* e *in vitro* para entender el desarrollo biológico y la medicina regenerativa en ratón (Boheler *et al.*, 2002).

## 5. CÉLULAS GERMINALES PRIMORDIALES (CGPs)

Las CGPs son las células madre germinales, precursoras embrionarias de los gametos en los vertebrados (Loeffler y Pottern, 1997). Las CGPs constituyen el único linaje celular capaz de transmitir el genoma a la siguiente generación; debido a esto, es posible afirmar que las CGPs son esenciales para la sobrevivencia de las especies. Esta capacidad de las células germinales para participar en el proceso de desarrollo embrionario una y otra vez, indican que las CGPs son potencialmente inmortales (Donovan *et al.*, 1997; Donovan, 1998; Tsang *et al.*, 2001).

Las células germinales de mamíferos sufren cambios genéticos y celulares, que llevan a que estas células desarrollen y diferencien hacia un gameto funcional. La proliferación, mantenimiento y la diferenciación de las CGPs a ovocitos primario y células madre espermatogoniales se ven influenciada por el número y función de las células germinales que están presentes posteriormente para la gametogénesis. Durante muchos años, la actividad de la fosfatasa alcalina tejido no-específico (TNAP) se ha utilizado como marcador para las CGPs y para poder seguir la ruta de migración desde la base del alantoides hasta la entrada en las crestas genitales, el lugar de las futuras gónadas (McLaren, 2003). La alta expresión de esta enzima en las CGPs es una característica mostrada también por las células madre pluripotentes o CME. La migración de las CGPs ocurre aproximadamente en los días 7 -10 dpc en el ratón (Freeman, 2003). En el ratón las CGPs se originan en el epiblasto proximal (Ginsburg *et al.*, 1990). Estudios indican que ya desde los 6.25 dpc, la línea germinal puede ser identificada en una población fundadora de tan sólo 6 células de epiblasto que expresan la proteína *Blimp 1* (B-lymphocyte-induced maturation protein-1) (MacLaren y Lawson, 2005; Ohinata *et al.*, 2005; Vincent *et al.*, 2005). *Blimp* codifica un represor transcripcional, originalmente

identificado por su función en la regulación de la diferenciación del plasma (Turner *et al.*, 1994; Shaffer *et al.*, 2002; Shapiro-Shelef *et al.*, 2003). En las CGPs, Blimp1 funciona para formar un complejo con la metiltransferasa arginina Prmt5. Este complejo es muy importante en la programación epigenética específica de las células germinales (Ancelin, *et al.*, 2006). Ratones mutantes que carecen del alelo Blimp 1 generan muy pocas CGPs y presentan una conducta migratoria anormal (Vincent *et al.*, 2005).

Las CGPs se pueden identificar como un grupo de células en la base del alantoides a los 7.25 dpc (Ginsburg *et al.*, 1990; Tam y Zhou, 1996; Tsang *et al.*, 2001). La proteína morfogenética ósea 4 (*Bmp4*) (Lawson *et al.*, 1999) y *Bmp8b* (Ying *et al.*, 2000) son necesarios para la formación de la región posterior proximal extraembrionaria que da origen a las CGPs y a las células del alantoides en el ratón. Los genes *fragilis* y *stella* también tienen funciones importantes en la competencia y desarrollo de las células germinales primordiales. *Fragilis* es una proteína transmembrana y parte de una gran familia interferón inducible de genes conservados evolutivamente, presenta una función anti proliferativa y puede servir para aumentar el tiempo del ciclo celular en CGPs. Este gen también es expresado en las CME, sugiriendo un rol potencial en el estatus pluripotencial (Saitou *et al.*, 2002), además aparece expresado en la zona del epiblasto proximal al 6.0 dpc y la expresión se ve incrementada en un grupo celular de 150 células a los 7.2 dpc. Similarmente *stella* tiene una función durante el desarrollo de pluripotencia y está asociado con el remodelamiento de la cromatina o el procesamiento de RNA. Las células germinales *stella* positivos expresan una represión de genes homeobox, la cual puede explicarse la retención de pluripotencia (Saitou *et al.*, 2002). *Stella* es expresado a partir de 7.2dpc en la región del grupo de CGPs, en el centro de la región de expresión de *fragilis*, siendo específico para células germinales. El análisis inmunohistoquímico ha demostrado que la proteína homólogo vasa de ratón (*mvh*) es exclusivamente expresado

en las CGPs justo antes de su colonización de las gónadas embrionarias y en las células germinales que se encuentran en procesos gametogénicos hasta el estado post meiótico tanto en machos como en hembras. (Toyooka *et al.*, 2000). El receptor tirosina-cinasa (*c-kit*), cuyo ligando es el Factor Stem Cell (*SFC*), también son esenciales para mantener las CGPs en ambos sexos. En el testículo adulto, el receptor *c-kit* es re-expresado en las espermatogonias diferenciales, pero no en las células madre espermatogoniales. (Rossi *et al.*, 2000).

Las CGPs empiezan a migrar hacia el mesodermos embrionario a los 8.5 dpc, luego se desplazan a través de intestino posterior del endodermo a los 9.5 dpc, sigue a lo largo del mesenterio dorsal a los 10.5 dpc, hasta llegar finalmente a colonizar las crestas gonadales a los 12.5 dpc. Durante la migración las CGPs proliferan e incrementan en número desde 100 células a los 8.5 dpc hasta 1000 a los 10.5 dpc y 4000 a los 12.5 dpc (Wylie *et al.*, 1985). Las CGPs continúan proliferando después de llegar a las crestas genitales en donde se encuentran unas 25000 células a los 13.5 dpc (Godin *et al.*, 1990; Tam and Snow, 1981). Las CGPs regulan autónomamente su crecimiento; *in vivo*, las CGPs detienen su proliferación a los 12 – 13 dpc, similarmente *in vitro*, las CGPs también detendrá su proliferación en el momento que corresponde a los 12 – 13 dpc (Ohkubo *et al.*, 1996).

Existe la hipótesis que la migración de las CGPs se encuentra controlado por un mecanismo de repulsión que participan las proteínas *Fragilis* y *Fragilis 3*. Las células germinales que expresan *fragilis 3* son repelidos de las células adyacentes que expresan *fragilis*. Sin embargo, si ambas *fragilis* y *fragilis 3* son expresadas por las células germinales, el efecto de repulsión es inactivado (Tanaka *et al.*, 2005). Por lo tanto la repulsión solo se da cuando las células germinales, que originalmente expresan *fragilis* y



*fragilis* 3, detienen la expresión de *fragilis* pero continúa la expresión de *fragilis* 3. Además, el RNAi produce el silenciamiento de *fragilis* dando lugar la prevención de la migración de las CGPs hacia fuera del mesodermo. Una vez en la cresta gonadal, las CGPs, pierden su conducta de motilidad (Wylie *et al.*, 1985).

Una reciente evidencia ha demostrado que la expresión del gen *Nanog* es esencial para la maduración de las CGPs en la cresta genital durante el desarrollo embrionario (Chambers *et al.*, 2007). La maduración de las Células Madre Germinales (CMG) a partir de CGPs está asociada con el silenciamiento de la expresión de *Nanog*, induciendo que este gen se encuentra relacionado en el estado de pluripotencia. Mientras que las CGPs se establecen en las gónadas, estos empiezan a diferenciarse a CMG, las cuales se dividen por mitosis para producir un suministro de gametos que requiere el organismo para la reproducción. Son conocidas como espermatogonias A en el macho, a estas simples células que pueden autorrenovarse o producir espermatogonias intermedias, predestinadas a diferenciarse en espermatozoides maduros (De Rooij *et al.*, 2001).

En los machos, las células germinales se detiene en la etapa  $G_0/G_1$  del ciclo celular mitótico (McLaren, 1984). La meiosis no se inicia hasta después del nacimiento. En machos y hembras, la meiosis es iniciada por la expresión del *gen estimulado por ácido retinoico 8 (stra8)*, que a su vez esta expresión se encuentra estimulada por el ácido retinoico (Koubova *et al.*, 2006). El ácido retinoico es provisto por el mesonefros de ambos sexos a los 13.5 dpc. Sin embargo en testículo la meiosis es retardada por la acción de la enzima que degrada retinoide (CYP26B1). En ausencia de CYP26B1, las células germinales entran a meiosis prematuramente como en un ovario normal (Bowles *et al.*, 2006).

## 6. SIMILARIDAD ENTRE CÉLULAS MADRE PLURIPOTENTES O EMBRIONARIAS Y LAS CÉLULAS GERMINALES PRIMORDIALES

Las CGPs y las CME comparten un gran número de marcadores moleculares. marcadores pluripotentes, tales como Oct4 y SSEA1, se expresan tanto en CME y CGPs, además los marcadores de las CGPs como *Blimp1*, *mvh*, *fragilis* y *stella* y aún los marcadores de las células germinales específicas como *Piwi2*, *Rnh2*, *Tdrd1* y *Tex14* han sido detectados en las CME (Geijsen *et al.*, 2004; Qing *et al.*, 2007; Mise *et al.*, 2008). TNAP, es otro marcador molecular que está fuertemente expresado en las CGPs y CME (Chicoine, 1954; Ginsburg *et al.*, 1990). Un análisis sistemático de la expresión en una única célula nos han revelado la dinámica de expresión de genes en células de línea germinal durante la especificación in vivo de CGPs (Yabuta *et al.*, 2006), indicando los patrones de expresión diferencial entre las CGPs y CME, por ejemplo la expresión de *Eras*, *T* y *Fgf8*.

Por el contrario, se han identificado dos marcadores para determinar una mejor separación de las CGPs precursoras de otras células diferenciadas, *fragilis* (*lftm3*) y *Dppa3* (también conocida como *Stella*) (Saitou *et al.*, 2002). *Dppa3* es expresado en embriones pre implantacionales y en células germinales (Sato *et al.*, 2002) y se ha reportado que tienen rol en la transcripción materna en el desarrollo de embriones pre implantacionales (Bortvin *et al.*, 2004). Las células *Dppa3* positivas muestran un incremento en la expresión de *fragilis* y siguen siendo positivas para *Tnap* y *Oct4* (Saitou *et al.*, 2002). Una vez que las CGPs *Dppa3* positivas inician la migración, estas empiezan a expresar marcadores adicionales, tales como el *receptor factor steel*, seguido por marcadores de las células germinales maduras, tales como *mvh* (Saitou *et al.*, 2002).

Varios reportes describen la diferenciación de las CME de ratón en células que expresan marcadores de las células germinales masculinas y femeninas (Geijsen *et al.*, 2004; Hubner *et al.*, 2003; Toyooka *et al.*, 2003). En cada uno de estos reportes, los marcadores de las células germinales fueron expresados por las CME, tales como *Dppa3* que nos ayuda a distinguir las células germinales a partir del ectodermo primitivo. Sólo la expresión de los marcadores de las células germinales maduras, tales como *mvh*, derivados *in vitro* de células germinales puede distinguirse de las CME. En otras investigaciones se han examinado la diferenciación de las CME humanas en células germinales (Clark *et al.*, 2004), la expresión de los ocho genes que son característicos de las CGPs fueron detectados en las CME humanas, pero la expresión de los seis genes que son característicos de las células germinales tardías no son detectados. Utilizando inmunocitoquímica en un cultivo de CME, se demostró que la mayoría de las CME humanas en una población expresan marcadores de las CGP como *stella* y *DAZL*, y que un grupo menor de células se viene diferenciando al azar en una población mixta que no está relacionado con los marcadores de las células germinales. Es importante destacar que al menos un gen específico de la célula germinal, *DAZL*, es expresado por las CME pero no por la MCI en humanos.

## **7. DIFERENCIACIÓN DE LAS CME EN CGPs.**

Estudios recientes han reportado la diferenciación de las CME de ratón en CGPs, así como también en gametos maduros masculino (Toyooka *et al.*, 2003; Geijsen *et al.*, 2004; Nayernia *et al.*, 2006) y femeninos (Hubner *et al.*, 2003) *in vitro* e *in vivo*. En el primer estudio en la producción de gameto *in vitro* (Hubner *et al.*, 2003) cultivaron CME de ratón que contiene al gen reportero *Pou5fl* sin células feeder o añadiendo factores de

crecimiento. Se observó la formación de estructuras como folículos ováricos y ovocitos que expresaban Pou5f1 y Ddx4. Estas células también expresaban genes marcadores meiótico (*Dmc1* y *Sycp3*), saliendo de los folículos después de 3 a 4 semanas de cultivo. Aunque el potencial de estas células no fueron evaluadas para la fertilización, estructuras semejantes a blastocistos se observaron a las 6 semanas, sugiriendo una espontánea activación partenogenética. Este estudio sugiere que las células derivadas de las CME o células madre pluripotentes tienen potencial para poder realizar gametogénesis *in vitro*.

En otras investigaciones se reportó la derivación de las células germinales masculinas a partir de las CME (Toyooka *et al.*, 2003) utilizando cuerpos embrionarios (CE) como material de inicio. Utilizando las CME que contienen como gen reportero a Ddx4, indujeron CE y encontraron que las células Ddx4 positivos aparecen espontáneamente, sugiriendo la presencia de células con características CGP post migratorias en CEs. Las células Ddx4 positivas fueron purificadas mezcladas con células de la cresta genital masculinos de embriones tipo silvestre. Después de la implantación dentro de testículos de ratón adulto, las células que fueron mezcladas formaron túbulos seminíferos que soportan una espermatogénesis completa derivado de las células purificadas Ddx4 positivo. Aunque la capacidad de los espermatozoides para fecundar no fue examinada, este estudio sugiere que las especificaciones de la línea germinal y la aparición de las CGP post migratorias pueden ocurrir espontáneamente o ser inducidas en CEs.

Otro estudio que utilizaron CEs, sugirieron una aparición espontánea de las CGP masculinas a partir de las CME de ratón *in vitro* (Geijsen *et al.*, 2004). Además detectaron y aislaron células haploides a partir de CEs y mostraron que la inyección de las células dentro de los ovocitos resultan en la formación estructuras como blastocistos. Aunque las células aisladas no se parecían a espermatozoides y el análisis de su desarrollo no se ha

completado, este estudio sugiere CGPs masculinas se originan de las CMEs y que espontáneamente las células post meióticas son capaces de activar a los ovocitos.

Estudios recientes han reportado no solo la inducción de los gametos masculinos a partir de las CMEs, sino también una producción exitosa de crías (Nayernia *et al.*, 2006). Se cultivaron CME de ratón las cuales fueron transfectadas con constructo reportero *Stra8* y luego también con el constructo reportero *Prm1* (protamina 1) en un cultivo monocapa. Se aislaron las células positivas para *Stra8* y *Prm1* y fueron inyectadas en los ovocitos. Resultaron 65 embriones que fueron transferidas a madres de alquiler, de estas 7 crías nacieron y contenían al gen reportero *Prm1*, la cual presentaban a anomalías y murieron después de los 5 meses de su nacimiento.

## **8. ESPERMATOGÉNESIS EN RATONES**

La espermatogénesis es la producción de espermatozoides desde las CGPs. Una vez que las CGPs llegan a la cresta genital de un embrión macho, quedan incorporadas a los cordones sexuales y estas permanecen ahí hasta la madurez, momento en que los cordones sexuales se ahuecan para formar los túbulos seminíferos y el epitelio de los túbulos se diferencia a células de Sertoli. En el tejido conectivo que se encuentra entre los cordones testiculares aparecen las células intersticiales (precursoras de las células de Leydig).

El comienzo de la espermatogénesis durante la pubertad probablemente está regulado por la síntesis de *Bmp8b* por la célula germinal espermatogénica, la espermatogonia. Cuando *Bmp8b* alcanza una concentración crítica, las células germinales comienzan a

diferenciarse. Las células en diferenciación producen elevados niveles de Bmp8b, que luego puede estimular más su diferenciación. Los ratones que carecen de Bmp8b no inician la espermatogénesis en la pubertad (Zhao et al., 1996).

El epitelio seminífero está compuesto por dos clases de células en el adulto: las células de Sertoli y las células germinales en diferentes fases de su desarrollo. Las células germinales espermatogénicas son unidas por las células de Sertoli mediante moléculas de cadherina-N sobre ambas superficies celulares y por moléculas de galactosiltransferasa sobre las células espermatogénicas que se unen a su receptor de carbohidrato sobre las células de Sertoli (Newton et al., 1993; Pratt et al., 1993). Las células de Sertoli nutren y protegen a las células espermáticas en desarrollo y la espermatogénesis.

En ratones tenemos que existe espermatogonias de tipo A1 al A4, la espermatogonia A4, tiene tres opciones: puede formar otra espermatogonia A4 (autorrenovarse); puede experimentar muerte celular (apoptosis); o puede diferenciarse al primer tipo de célula madre comprometida, la espermatogonia intermedia. Esta espermatogonia se encuentra comprometida a convertirse en espermatozoide, y se divide mitóticamente una vez que forma la espermatogonia tipo B. Las espermatogonias tipo B se dividen para formar los espermatoцитos primarios, los cuales duplican su ADN (ocurre durante 14 horas en ratón) e ingresan a divisiones meióticas originando espermatoцитos secundarios. Sin una síntesis posterior de ADN, los espermatoцитos secundarios resultantes se dividen una vez más para formar las células haploides conocida como espermátides. El núcleo de los espermatoцитos secundarios es de menor tamaño que el de los espermatoцитos primarios en diploteno mostrando una cromatina finamente granular. Las espermátides, redondas, se transforman en espermatozoides por una serie de cambios morfológicos progresivos llamados colectivamente espermiogénesis.

La primera etapa de la espermiogénesis consiste en la construcción de la vesícula acrosómica desde el aparato de Golgi. El acrosoma forma un casquete que cubre al núcleo del espermatozoide. A medida que se forma este casquete, el núcleo rota de modo tal que el casquete quedará después enfrentado a la membrana basal del túbulo seminífero. Esta rotación es necesaria debido a que el flagelo, que está comenzando a formarse desde el centriolo sobre el otro lado del núcleo, se extenderá hacia la cavidad. Durante el último estadio, el núcleo se aplana y se condensa, el citoplasma restante se desecha y las mitocondrias forman un anillo alrededor de la base del flagelo.

En el ratón, el desarrollo desde la célula madre a espermatozoide toma 34.5 días. El estadio de espermatogonia dura 8 días, el de meiosis 13 días y la espermiogénesis toma otros 13.5 días.

## **9. EFECTO DE LA CICLOFOSFAMIDA (CP) EN LA REPRODUCCIÓN MASCULINA**

Ciclofosfamida (CP) [N, N-bis (2-cloroetil) tetrahidro-2H-1, 3,2 oxaza- fosforin-2-amino 2-oxido], pertenece a la clase de los oxazafosforines, es un metabolito bioactivador y agente alquilante que tiene efectos citostáticos debido a la formación de aductos covalente de ADN. La citotoxicidad de la CP es mediada por la alquilación del ADN en la posición N7 de guanina y la formación de cross-links del tipo DNA-DNA y DNA-proteína, así como quiebres en una de las hebras del DNA (Hemminki y Kallama, 1986; Crook *et al.*, 1986). La terapia de CP es muy común en el tratamiento de una variedad de enfermedades glomerulares, pero este fármaco tiene como efecto secundario la toxicidad gonadal. CP es

utilizada en la quimioterapia contra distintos tipos de cáncer y como un inmunosupresor en el trasplante de órganos (Dollery, 1999).

La CP es un alquilante cuyo efecto citotóxico tiene como blanco a las células que se dividen rápidamente siendo el testículo un órgano muy sensible a los efectos deletéreos de este agente. CP interfiere con las actividades mitóticas y meióticas de la hilera germinal. Su mecanismo de acción consiste en alquilar el ADN, alterar la estructura de los ácidos nucleicos ya formados, por lo tanto la división celular no se realiza adecuadamente (Elangovan *et al.*, 2006). En el testículo CP interrumpe la meiosis antes de la etapa de paquiteno, produciendo un daño genotóxico. Las células eucariotas para mantener la estabilidad genética, detiene su ciclo celular, lo cual permite la activación de mecanismos de reparación del DNA, pero cuando el daño es severo, se activan vías de muerte celular tal como la apoptosis (Sancar *et al.*, 2004). Cuando los alquilantes se utilizan a bajas dosis, la recuperación de la espermatogénesis podría ocurrir dentro de los 3 años postratamiento, sin embargo, a altas dosis la infertilidad podría prolongarse o ser permanente (Shetty y Meistrich, 2005).

Pacientes varones con cáncer tratados CP presentan una mayor incidencia de oligozoospermia y azoospermia (Charak *et al.*, 1990; Kenney *et al.*, 2001), además se ha demostrado perturbaciones en la secreción de gonadotropinas asociado con el daño testicular junto con los bajos niveles de testosterona en la sangre (Hoorweg-Nijman *et al.*, 1992). Una simple inyección de dosis alta de CP durante el desarrollo de espermátocitos de ratón resulta en translocaciones heredables (Sotomayor y Cumming, 1975) e incrementa la incidencia de micronúcleos (Tates, 1992; Lahdetie, 1983,1988). El estudio morfométrico de los diferentes fases del ciclo espermatogénico



indica que la toxicidad testicular puede ser detectada a partir de los 7 días después de una simple administración oral de CP (100mg/kg) en ratas (Matsui *et al.*, 1995).

Se ha encontrado que a una dosis única de 200mg/kg de pc puede afectar negativamente epitelio seminífero de ratón (Vigil y Bustos-Obregón, 1985) y que en casos de exposición crónica, tras 5 semanas desde la última dosis, conlleva a la reducción del 84% en la concentración y 72% con respecto a la vitalidad espermática, disminución de la integridad del acrosoma en 59%, así mismo se evidencia una disminución drástica de los niveles para la hormona FSH y Testosterona, todos estos factores en conjunto dan como resultado la infertilidad en el 100% de los ratones tratados (Elangovan *et al.*, 2006).

## **10. INMUNOCIRUGÍA: AISLAMIENTO DE LA MCI DE LOS BLASTOCISTOS**

En la etapa de blastocisto en embrión consiste sólo en dos tipos de células la MCI y el trofoectodermo. Los blastocistos de ratón son susceptibles a la citotoxicidad anticuerpo-complemento. La Inmunocirugía desarrollada por primer vez por Solter y Knowles (1975) en ratones y luego por Thomson *et al.* (1995) en primates y Thomson *et al.* (1998) en humanos, nos brinda una herramienta efectiva en el estudio del desarrollo potencial de la MCI y la interacción con el trofoectodermo. La técnica consiste en la incubación de los blastocistos con anticuerpo de conejo anti-ratón, un buen lavado y nuevamente incubado con complemento, el resultado de este procedimiento, es la eliminación selectiva de las células del trofoectodermo y la preservación de la MCI. La MCI puede ser fácilmente separada del resto de células trofoectodérmicas y ser capaces de crecer y diferenciarse *in vitro*. Mediante el método de la Inmunocirugía se puede obtener un gran número de célula pura de la MCI y en un periodo relativamente corto.

## 11. TRANSPLANTE DE CÉLULAS MADRE

La técnica de Transplante de células madre a nivel de testículo fue descrita por primera vez en 1994, en la cual se utilizaron CMG y ratones inmunocompatibles (Brinster y Zimmermann, 1994). Ogawa *et al.* (1997) evaluó tres métodos para poder introducir células donadoras dentro de los túbulos seminíferos de un animal receptor: inyección a los túbulos seminíferos, inyección al conducto deferente y inyección a la rete testis, demostrando que esta última técnica es fácil y efectiva en ratones y ratas. El proceso básico consiste en recolectar células madre de un animal donador e inyectarlas en los túbulos seminíferos del animal receptor, con el objetivo que las células madre del donador colonice la membrana basal de los túbulos en busca del nicho donde se desarrollan las células madre y se diferencie para que pueda realizar la espermatogénesis en los testículos del animal receptor. Previos estudios han demostrado que inyectando células donadoras han podido colonizar los túbulos de un ratón receptor (Brinster y Avarbock, 1994; Brinster y Zimmermann, 1994), además se han reportado la presencia de espermatogénesis intraluminal en los túbulos seminíferos cuando se inyecta las células donadoras vía rete testis (Jiang y Short, 1995 en ratas y Guzmán, 2005 en ratones). Cabe resaltar que no existen trabajos previos de colonización intraluminal a partir del transplante de células de la MCI en ratones.

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **1. MATERIALES**

##### **1.1. MATERIAL BIOLÓGICO**

###### **1.1.1. OBTENCIÓN DE LA MCI Y EFECTO DE LA CICLOFOSFAMIDA**

Se utilizaron 8 parejas de ratones de la cepa Swiss Rockefeller, machos de 10 a 12 semanas de edad y de fertilidad comprobada y hembras vírgenes de 6 a 8 semanas de edad (Figura 1), para poder obtener los embriones en estado de blastocistos y a partir de estos las células de la MCI. Por otro lado se utilizaron 14 ratones machos de la cepa C57BL (8 a 10 semanas y de fertilidad comprobada) (Figura 2), 6 de ellos fueron utilizados para determinar el efecto de la Ciclofosfamida sobre los túbulos seminíferos, a los otros 8 ratones se les transplantó las células madre. Todos los animales fueron obtenidos del Bioterio del Laboratorio de Reproducción y Biología del Desarrollo de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM, mantenidos en condiciones estándares (14 horas de luz y 10 horas de oscuridad, temperatura promedio de 23°C) (Figura 3), alimentados con dieta balanceada para animales (Purina- Perú) y agua *ad libitum*.

###### **2.1.2. OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-BAZO DE RATÓN**

Para la producción de anticuerpos anti-ratón y complemento se utilizaron un conejo (*Oryctolagus cuniculus*) de la raza Nueva Zelanda de 3 meses y con peso de 3.0 kg y un cobayo (*Cavia porcellus*) de 2 meses de 1.2 kg respectivamente.



*Figura 1. Ratones de la cepa Swiss Rockefeller*



*Figura 2. Ratones machos de la Cepa C57BL*



*Figura 3. Bioterio del Laboratorio de Reproducción y Biología del Desarrollo*

## **1.2. MATERIALES DE LABORATORIO**

### **1.2.1. REACTIVOS**

- Ciclofosfamida [N, N - bis (2 - cloroetil) tetrahidro - 2H -1, 3, 2 -oxazafosforin - 2 - amino 2 - oxido] – NEOPHOS 200 mg
- Medio HTF con HEPES (LifeGlobal)
- Medio Flushing con Heparina (MediCult)
- Aceite Mineral (LifeGlobal)
- Buffer Fosfato Salino (PBS)
- Suero Fetal Bovino (SIGMA)

- Tripsina/EDTA
- Medio RPMI 1640 (GIBCO)
- Ácido Tyrodes (MediCult)
- Ketamina
- Lidocaína
- Azul de Tripan
- Carbonato de Litio
- Ácido Acético
- Formol 40%
- Agua destilada
- Suero Fisiológico
- Alcohol (70°, 80°, 90°, 96, 100°)
- Xilol
- Paraplast.

### **1.2.2. EQUIPOS**

- Microscopio AMPLIVAL Carl Zeiss Jena
- Microscopio estereoscópico Bausch-Lomb
- Microscopio estereoscópico Leica Zoom 2000
- Lámpara para estereoscópio
- Incubadora Aire Seco
- Cámara fotográfica digital Canon S-50
- Balanza analítica Sartorius
- Balanza digital

- Micrótomoto rotativo Minot
- Plancha termoregurable Chicago Surgical and Electrical Co
- Fotoperiodo
- Jarras Paraplast
- Refrigeradora.

### **1.2.3. INSTRUMENTAL**

- Pinzas de acero de punta fina
- Tijeras punta fina
- Placas embriológicas de vidrio
- Láminas excavadas
- Aguja hipodérmica 30G
- Pipetas Pasteur
- Mechero de alcohol
- Filtro de 0.22 $\mu$
- Micropipetas 10 – 100ul
- Jeringas de tuberculina
- Tips
- Parafilm (American Can Company)
- Placas de vidrio 10x20 cm
- Guantes
- Gorros
- Mascarillas descartable

## **2. MÉTODOS**

### **2.1. TRATAMIENTO CON CICLOFOSFAMIDA**

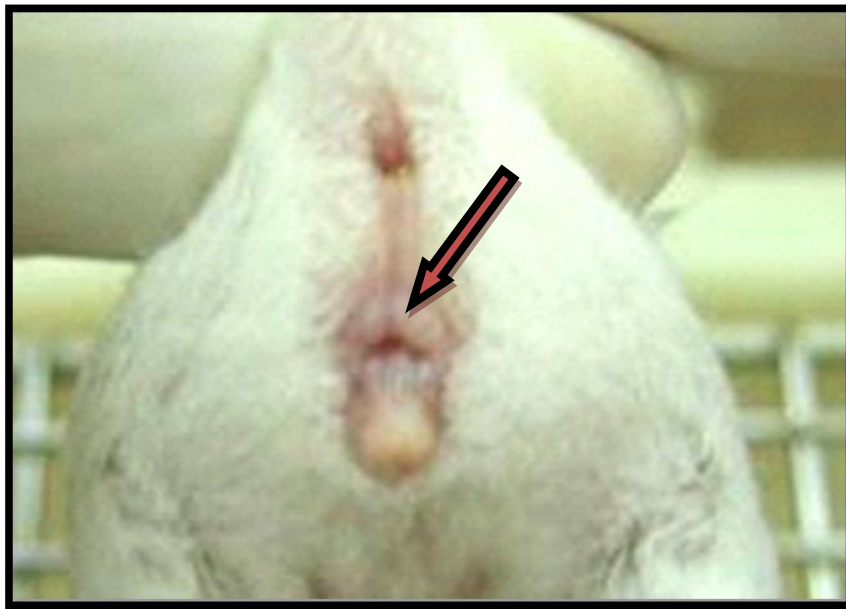
La Ciclofosfamida (NEOPHOS) obtenida en farmacias locales, fue disuelta en solución salina 0.9% obteniendo una concentración final de 220mg/Kg [dosis equivalente a la dosis terapéutica en humanos (750mg/kg)]. Se utilizaron 8 ratones machos de la cepa C57BL como receptores, a cada uno se les inyectó intraperitonealmente una dosis única de CP 4 días antes del trasplante de las células madre. En un ensayo previo, se utilizaron 3 ratones machos de la misma cepa para determinar el efecto de la CP a 4 días (se les inyectó a cada uno CP a 220mg/kg), otros 3 ratones fueron utilizados como control, a quienes se les inyectó solución salina 0.9%.

### **2.2. RECUPERACIÓN DE BLASTOCISTOS**

Se seleccionó ratonas de la cepa Swiss Rockefeller que presentaban estró (Figura 4). Esta fase se caracteriza por presentar la vulva con una vagina abierta y rosada, poco húmeda, con estrías pronunciadas y se encuentran receptivas a los machos. Aquellas ratonas se colocaron con machos de la misma cepa entre 7:00 y 7:30 p.m, dejándolos juntos toda la noche para que puedan cruzarse. La mañana siguiente se evaluó la presencia de tapón vaginal (Figura 5) como indicador de preñez y se consideró las 12:00 de la noche como cero horas del desarrollo embrionario. Las ratonas preñadas fueron sacrificadas por dislocación cervical a los 3.5 - 4.0 dpc, momento en que los embriones se encontraron en el estado de blastocistos en los cuernos uterinos. (Figura 6). Se desgarró la piel de la región media del vientre mediante un corte con la tijera y se separó



dirigiéndose hacia los extremos del animal. Se ubicaron los cuernos uterinos, se separaron y fueron colocados en una placa embrionaria que contiene medio HTF con HEPES (LifeGlobal); se eliminó con ayuda de pinzas todo exceso de grasa. Utilizando una jeringa de tuberculina con una aguja 30G1/2 y con 0.5ml de medio Flushing (MediCult), se perfusionaron los cuernos uterinos (Figura 7 y Figura 8), luego estos fueron retirados de la placa y con ayuda de un estereoscopio fueron ubicados los embriones.



*Figura 4. Ratona de la cepa Swiss Rockefeller presentando estro. La flecha indica a la vulva con una vagina abierta y rosada, poco húmeda, con estrías pronunciadas.*



*Figura 5. Presencia del Tapón vaginal (indicador de preñez). Observar flecha.*

### **2.3. OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS DE CONEJO ANTI-BAZO DE RATÓN Y COMPLEMENTO DE COBAYO**

Para la obtención de anticuerpos anti-ratón, se utilizó un conejo macho de la raza Nueva Zelanda al cual se le inyectó una concentración de células de bazo de ratón de  $4 \times 10^8$  células por ml, vía vena marginal de la oreja del conejo siguiendo el protocolo 1 (Anexo 1).

Se recuperó 15 ml de sangre por sangría parcial de conejo, luego se colocó 3ml en cada tubo Vacuteiner de 15ml con gel de sílica y se llevó a centrifugación a 2500rpm. El suero obtenido fue colocado en tubos eppendorf a volumen de 15µl y mantenido a -20°C hasta su uso. Antes de utilizar, el suero fue colocado en Baño María a 56°C por 30 minutos para su descomplementación y fue diluido 1:10.

Para la obtención de complemento se utilizó un cobayo macho, al cual se le realizó una sangría total. La sangre obtenida fue colocada en tubos Vacutainer con gel de sílica y centrifugada a 2500rpm. El suero obtenido fue colocado en tubos eppendorf a volumen de 15µl y mantenidos a -20°C hasta su uso.

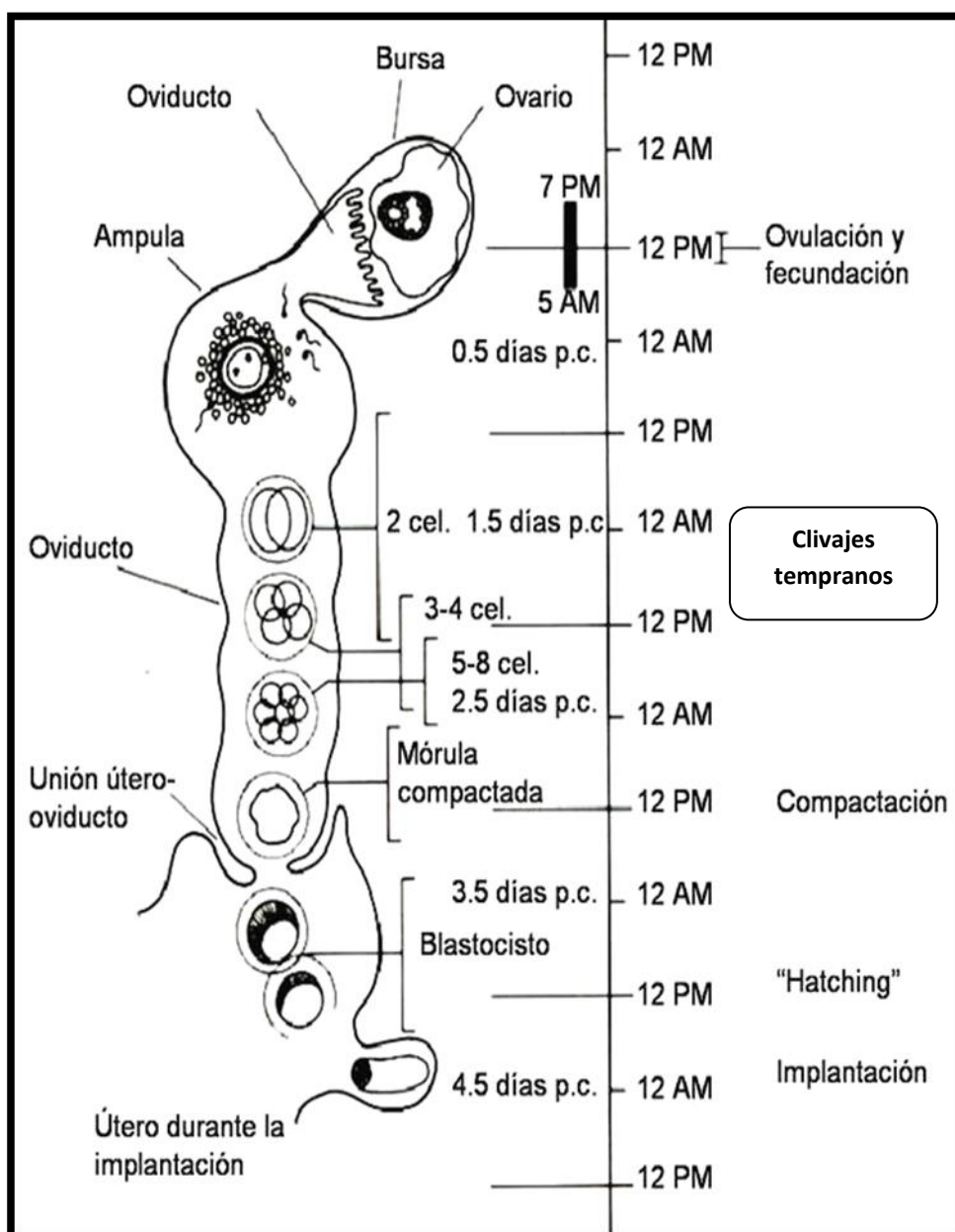
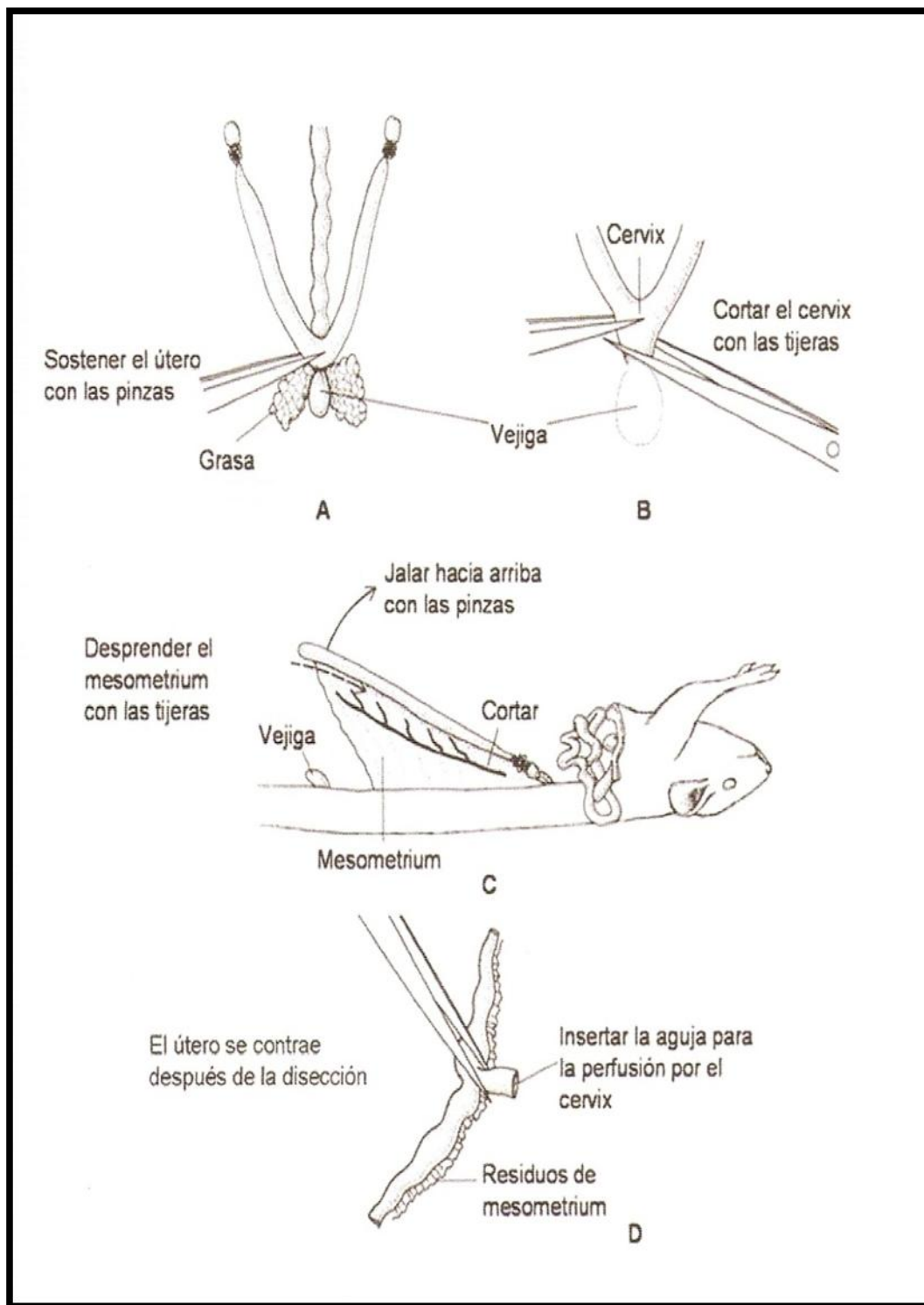
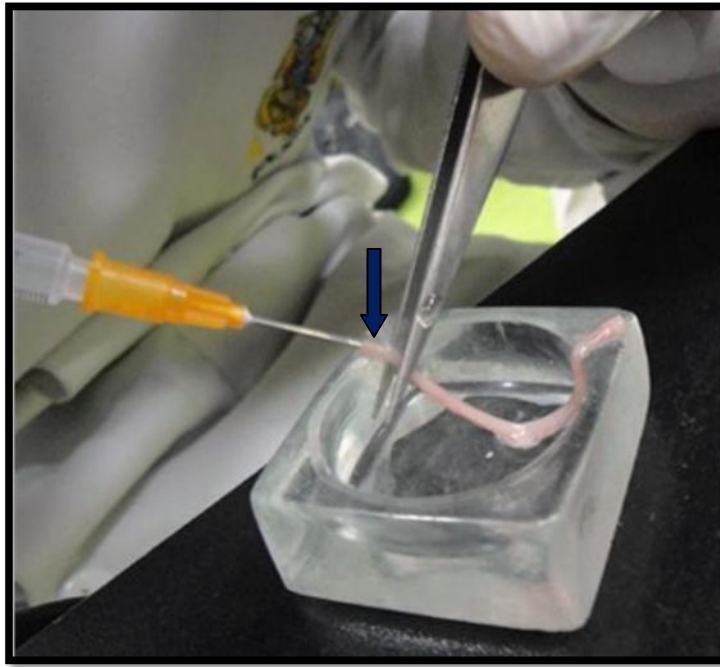


Figura 6. Resumen del desarrollo preimplantacional de ratón por Hogan (1994).



*Cel.* = células, *p.c.* = post-cópula

Figura 7. Disección del útero para la obtención de los embriones preimplantacionales de *Mus musculus*. (A) y (B). El útero es removido mediante un corte en el cervix. (C) El mesometrium es desprendido y se realiza un corte entre la unión del útero con el oviducto. (D) El útero es colocado en una placa y luego cada cuerno es perfusionado con 0,5 mL de medio. (Hogan, 1994).



*Figura 8. Perfusión de los cuernos uterinos. La flecha señala la aguja hipodérmica en el interior del cuerno uterino.*

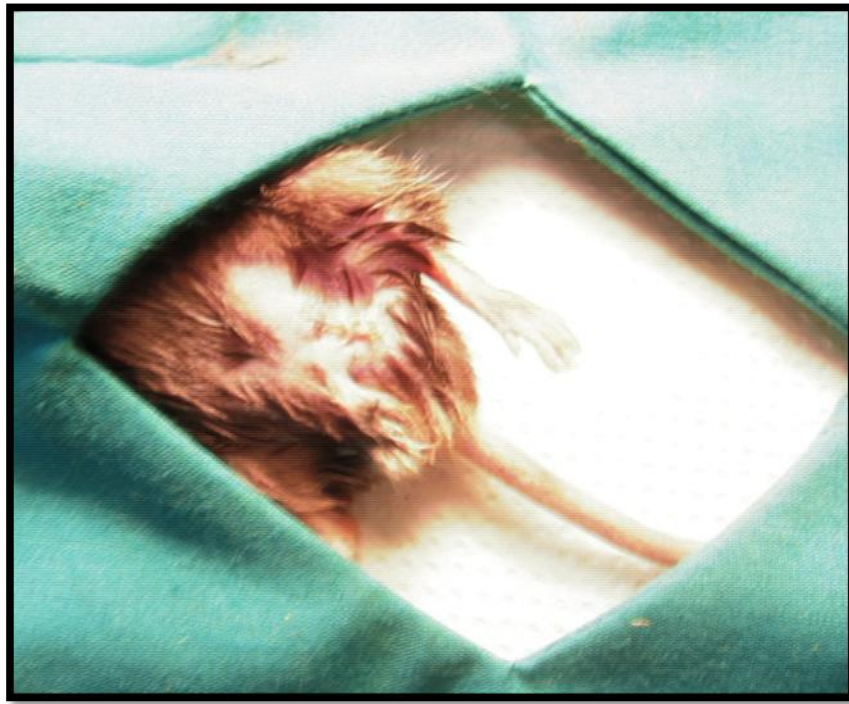
## **2.4. INMUNOCIRUGÍA**

La Inmunocirugía de blastocistos de ratón fue realizada con algunas modificaciones al procedimiento desarrollado por Solter y Knowles (1975). La zona pelúcida fue removida utilizando ácido Tyrode's por 5 min, luego los embriones fueron lavados tres veces con PBS por 3 min cada uno. Antes de la exposición de antisuero, los blastocistos fueron incubados a 37°C en medio HTF con HEPES (LifeGlobal) por 30 min. Los blastocistos libres de zona pelúcida fueron expuestos a los anticuerpos de conejo anti-bazo de ratón diluido 1:10 por 30 minutos y luego fueron lavados tres veces con PBS por 5 minutos cada uno. A continuación los blastocistos fueron transferidos al complemento de cobayo (diluido a 1:10) con medio HTF con HEPES e incubado por 20 minutos a 37°C. Seguidamente la MCI fue colocada en gotas de solución Tripsina-EDTA e incubada por 5 minutos para permitir la disgregación de las células de la MCI. Las células de la MCI

fueron lavadas tres veces con PBS y luego colocadas en medio HTF con HEPES y coloreados con Azul de Tripán (colorante vital), con el objetivo de visualizar el ingreso de las células en el interior de los túbulos seminíferos. La suspensión de células a una concentración de  $3 \times 10^2$  células por ml fue cargada en la pipeta de inyección.

## **2.5. MICROINYECCIÓN DE CÉLULAS MADRE EN LA RETE TESTIS**

Para la realización de la Microinyección, el ratón fue anestesiado con 0.15 ml de Ketamina + 0.15ml de suero fisiológico 0.9% (Figura 9), una vez anestesiado el ratón se prosiguió a remover los testículos de la cavidad corporal para el reconocimiento de la rete testis. La rete testis es una compleja organización de conductos interconectados, situados en la parte alta del testículo. La porción más accesible de la rete testis se localiza en la zona craneal del pedículo vascular donde llega el conducto eferente a la superficie del testículo, por tanto la rete testis fue localizada siguiendo el conducto eferente a la superficie de los testículos. Cargada la pipeta de inyección con las células de la MCI y coloreadas con Azul de Tripán se inyectó directamente a la rete testis del testículo izquierdo del ratón, el testículo derecho es usado como control al cual se le inyectó sólo medio HTF con HEPES + Azul de Tripán. Para la inyección se utilizó una pipeta aguda de 50 a 80µm de diámetro, la cual se insertó en un ángulo de 30° y una profundidad no mayor a 2mm en la rete testis. El llenado de los túbulos seminíferos siguió un camino al azar. La presión en la pipeta no fue incrementada rápidamente ya que puede ocurrir una ruptura interna de los límites de la rete testis. El volumen a inyectar en cada testículo fue de 50µl.



*Figura 9. Ratón Anestesiado con Ketamina + suero fisiológico 0.9%*

## **2.6. ANÁLISIS DE RECEPTORES**

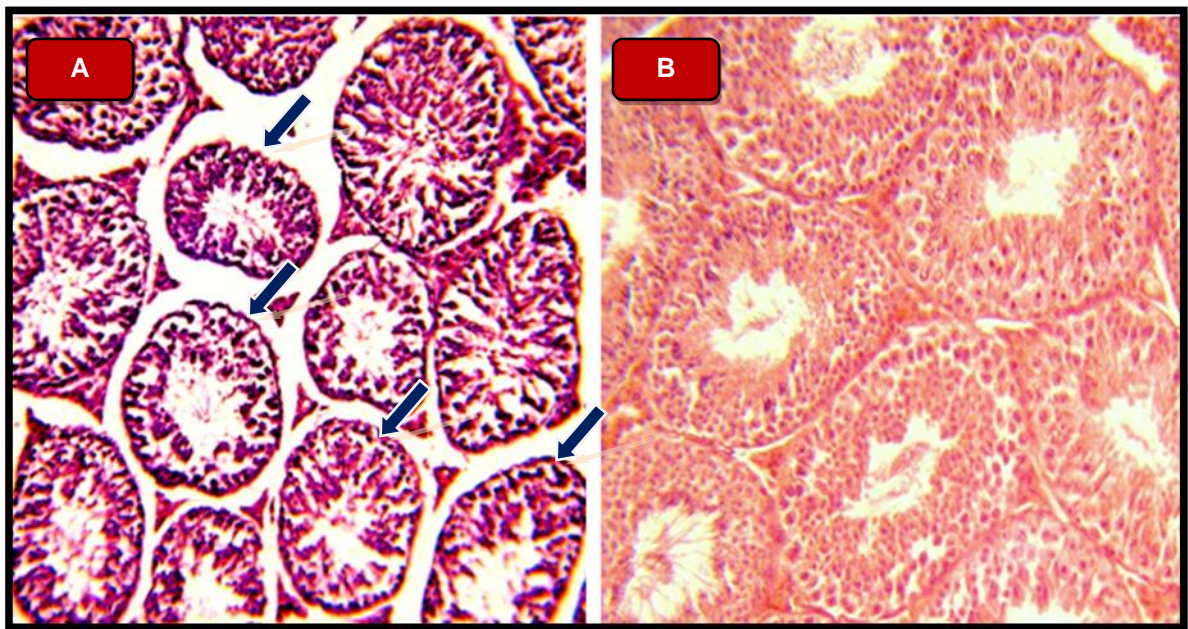
Después de los 35 días, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical, se les extrajo los testículos y estos fueron fijados con Bouin (Anexo 2) por aproximadamente 16 horas, luego se siguió el protocolo 2 (Anexo 3) para la deshidratación y parafinado de las muestras. Una vez que se obtuvieron las muestras parafinadas, con ayuda de un micrótopo rotativo Minot se procedió a obtener los cortes histológicos de 5  $\mu$ m de espesor, los cuales fueron coloreados con hematoxilina y eosina Y siguiendo el protocolo 3 (Anexo 4).



#### IV. RESULTADOS

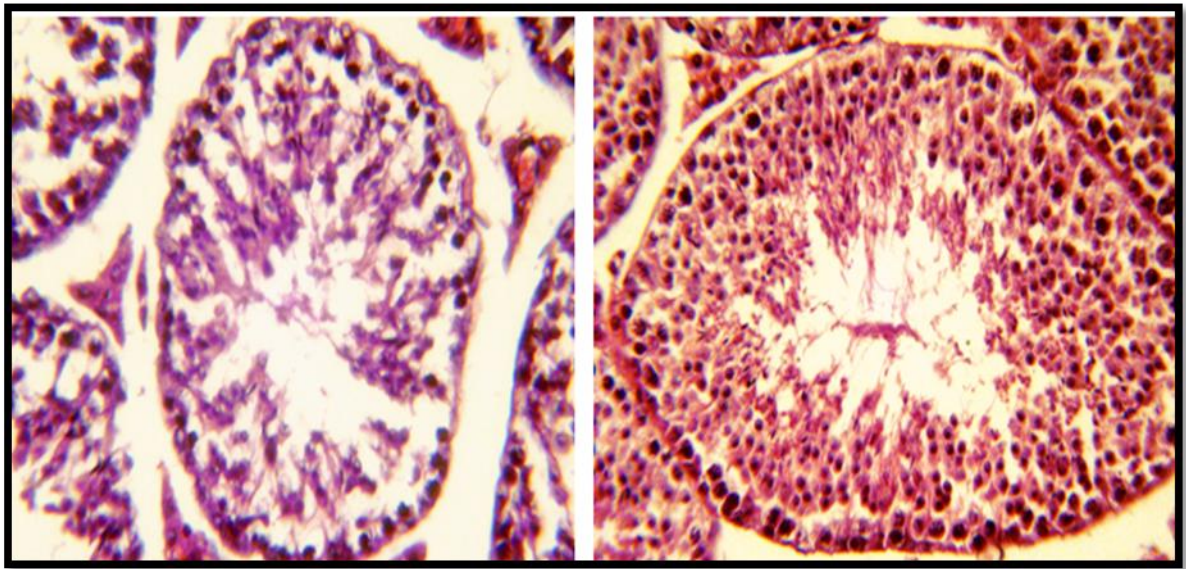
##### 1. EFECTO DE LA CICLOFOSFAMIDA: OBSERVACIÓN EN LA HISTOLOGÍA TESTICULAR

Se observó una severa alteración morfológica producida en los túbulos seminíferos de ratones tratados con Ciclofosfamida 220mg/kg comparados con el control a 4 días de la inyección, entre estas alteraciones se puede mencionar una reducción en el tamaño del túbulo seminífero, pérdida parcial del tejido intersticial (Figura 10) y en el número de células espermatozonales (Figura 11).



*Figura 10. Sección de túbulo seminífero de ratón BalbC57. A. Tratamiento con Ciclofosfamida 220mg/kg (100X); B. Control (100X). Note el tamaño de los túbulos (flecha).*



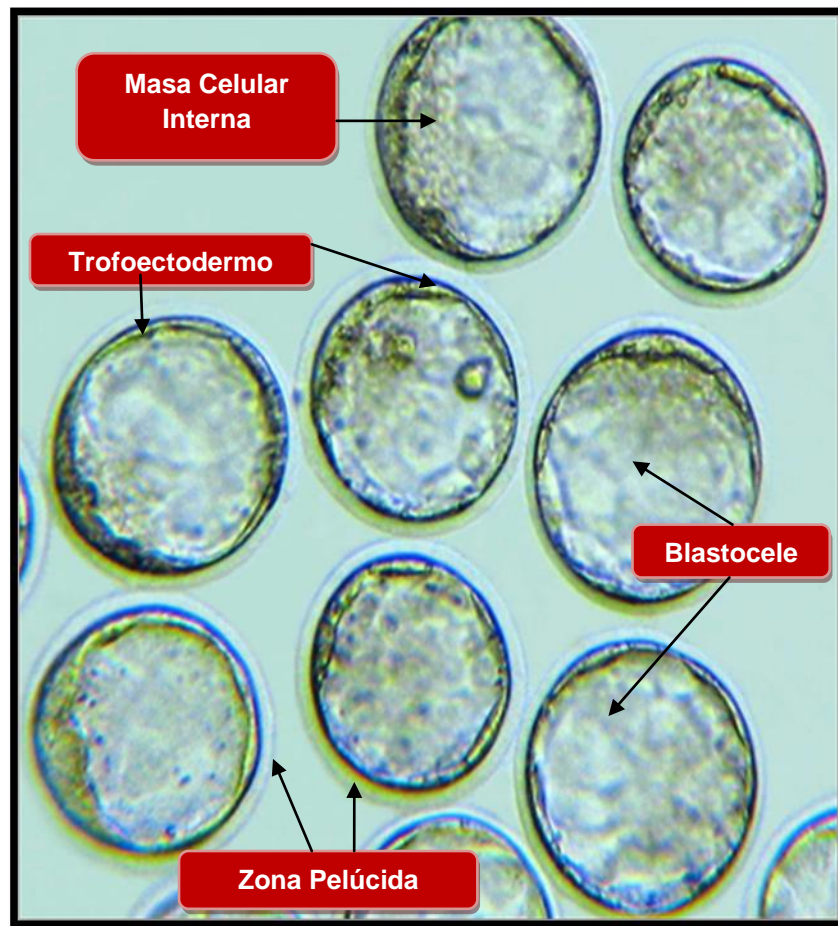


**A** Figura 11. Túbulo seminífero de ratón Balb/c tratado con Cyclofosfamida (630X); **B**. Control (630X). Nótese la reducción de células espermatogoniales.

### 3. RECUPERACIÓN DE BLASTOCISTOS E INMUNOCIRUGÍA

#### 3.1. RECUPERACIÓN DE BLASTOCISTOS

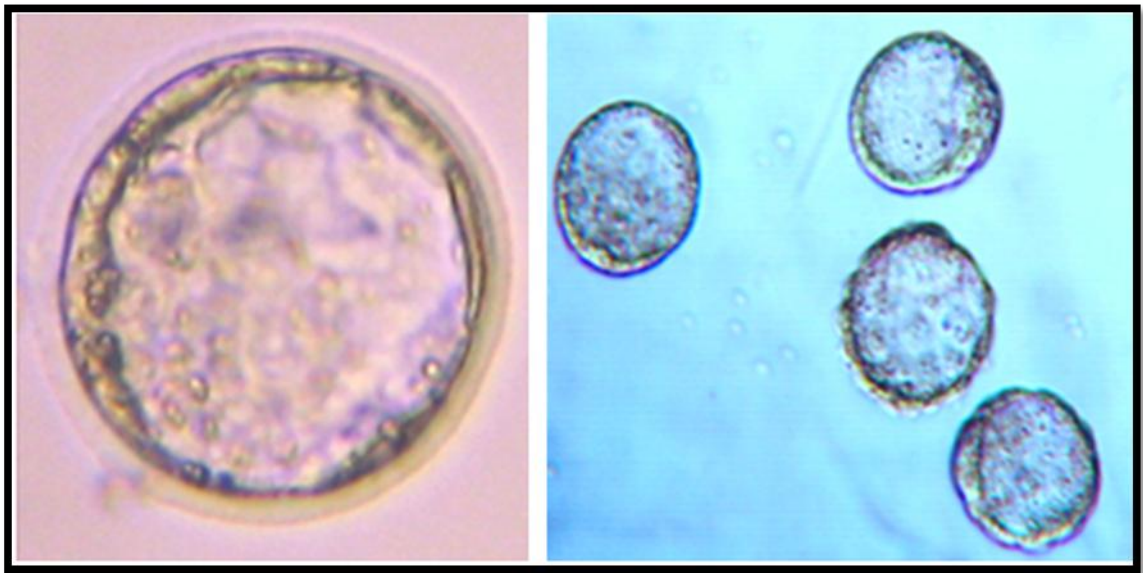
Se obtuvieron los embriones en estado de blastocisto expandido mediante perfusión del cuerno uterino a los 3.5 - 4.0 dpc, los cuales presentaban buenas características morfológicas (diferenciación normal entre las células de la MCI y el trofoectodermo y un amplio blastocelo) (Figura 12).



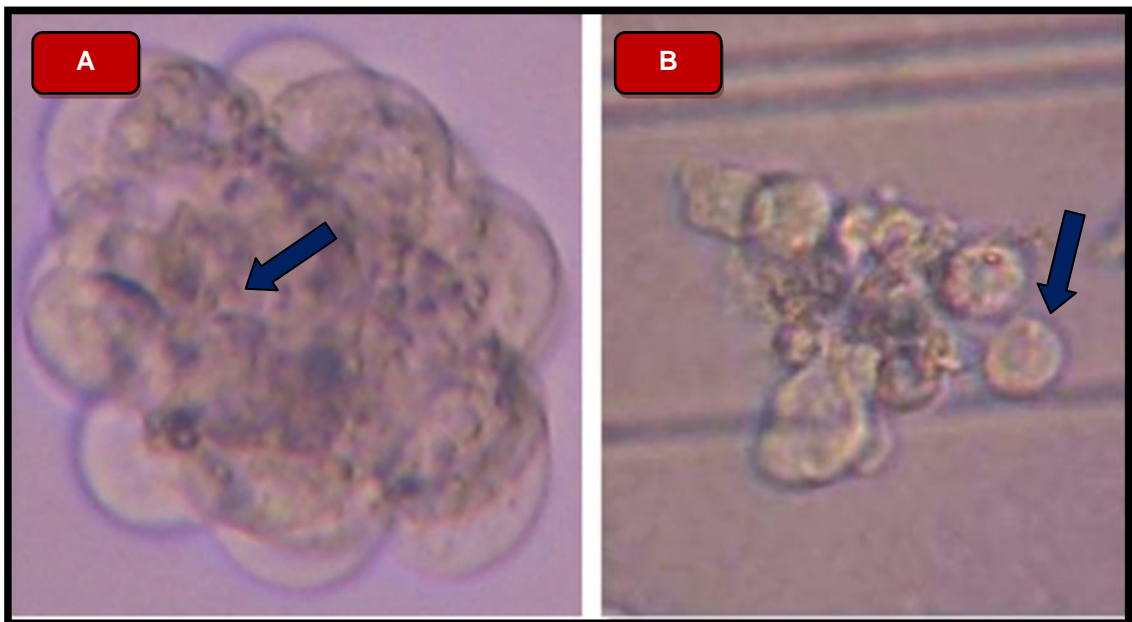
*Figura 12. Blastocistos de ratón (100X). Nótese la masa celular interna, trofoectodermo, zona pelúcida y el blastocele*

### 3.2. INMUNOCIRUGÍA

Con la solución Ácida de Tyrode's se destruyó exitosamente la zona pelúcida (Figura 13), para luego enfrentarlo a los anticuerpos anti-ratón y complemento de cobayo (Figura 14A) y finalmente mediante pipeteo suave obtuvimos las células de la MCI (Figura 14B).



**A** 13. Blastocisto con zona pelúcida (250X). **B** Blastocistos sin zona pelúcida (100X).

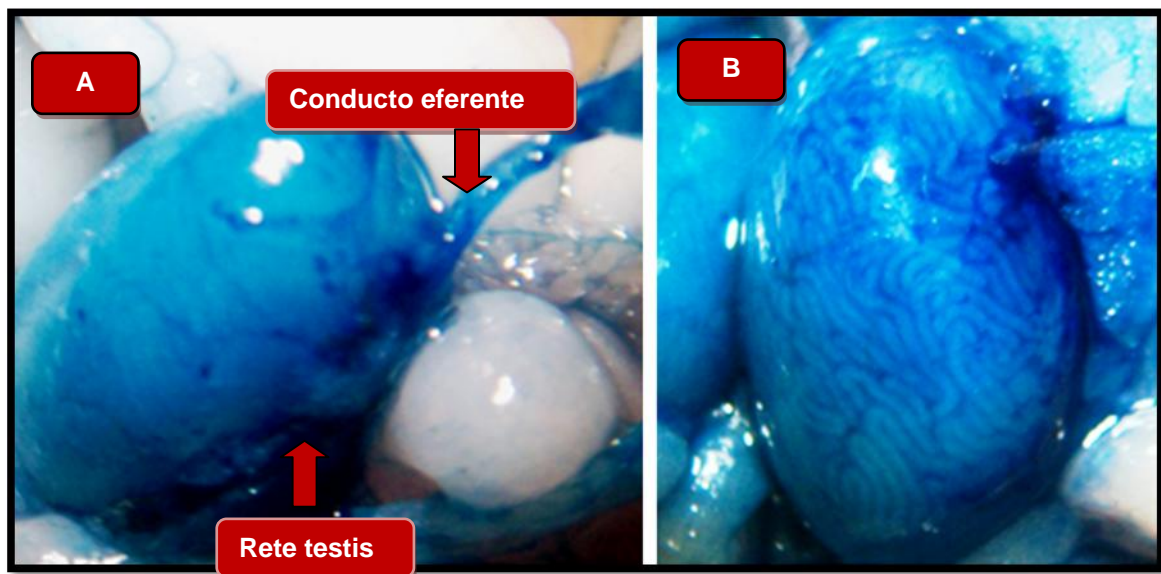




*Figura 14. A. Blastocisto sin zona pelúcida expuesto a anticuerpos anti-ratón; B. Mediante pipeteo suave se empieza a separar la MCI y las células lisadas del trofoectodermo. La flecha indica la MCI y la estrella el trofoectodermo lisado (250X)*

#### **4. INYECCIÓN A LA RETE TESTIS**

Una vez recuperadas las células de la MCI fueron coloreadas con Azul de Tripán e inyectada exitosamente en la rete testis de los testículo de ratones adultos (Figura 15).



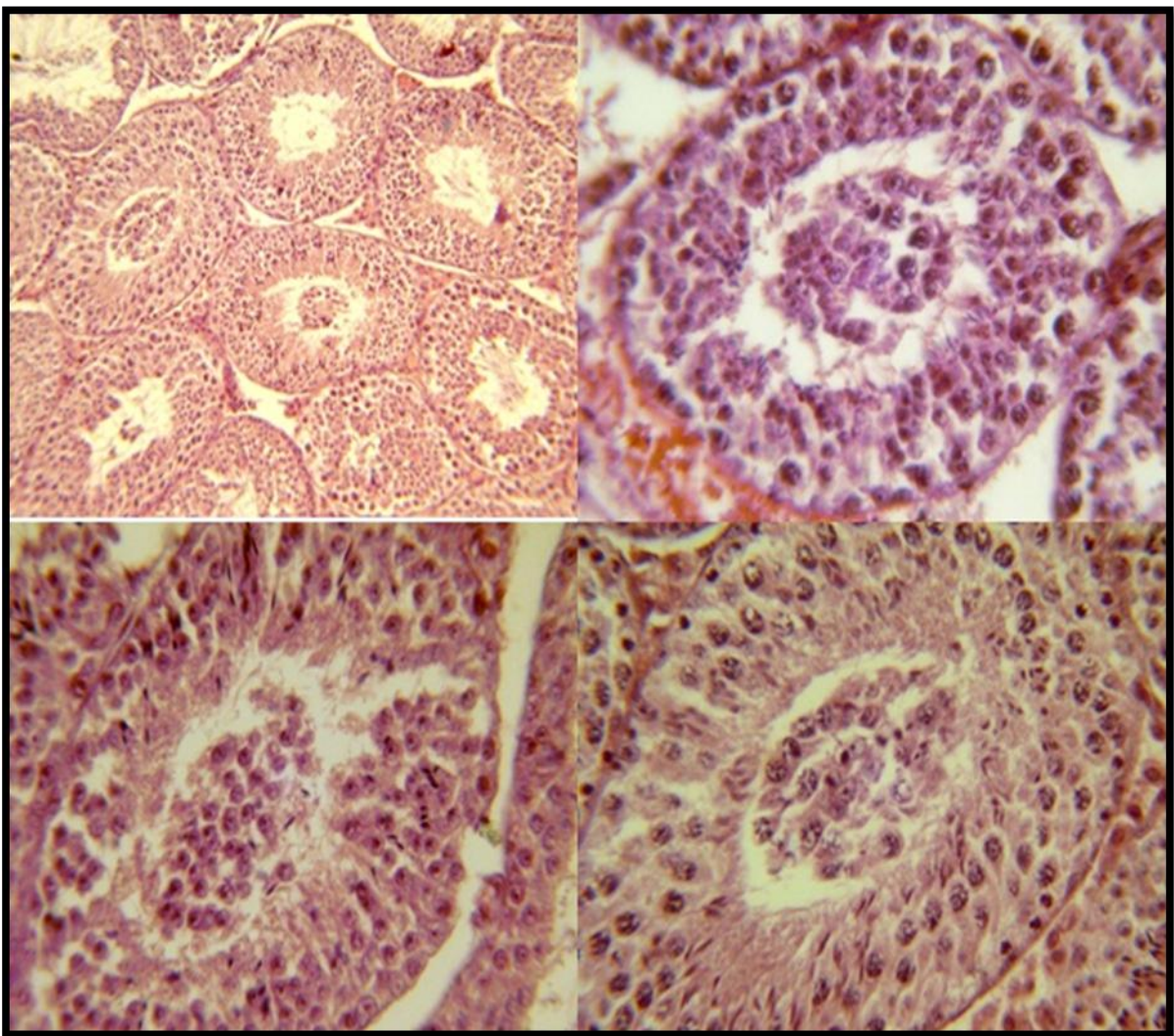
*Figura 15. A. Reconocimiento del conducto eferente y la rete testis (15X); B. Testículo de ratón evidenciando la inyección exitosa del colorante conteniendo las células de la MCI (20X)*

#### **5. ANÁLISIS DEL TRANSPLANTE DE LA MCI**

Se encontró que el 62.5% de los receptores evaluados presentaban colonización intraluminal, siendo esta colonización aleatoria en los túbulos seminíferos; en promedio se observó que sólo el 2% de los túbulos seminíferos muestran minitúbulos (Figura 16A). Los minitúbulos formados en el lumen de los túbulos seminíferos muestran una sincronización



respecto al epitelio seminífero del animal receptor (Figura 16B, 16C y 16D), estos presentan espermatogonias, espermatocitos primarios, espermátides además de una estructura similar a una membrana basal y de células de Sertoli las cuales mantienen el ciclo espermatogénico en los minitúbulos (Figura 17). Cabe resaltar, que esta colonización intraluminal es consecuencia del trasplante y diferenciación de las células de la MCI a testículos de ratones adultos, debido que aquellos ratones que se les inyectó sólo el medio HTF con HEPES + Azul de Tripán, no presentan los minitúbulos (Figura 18).



A

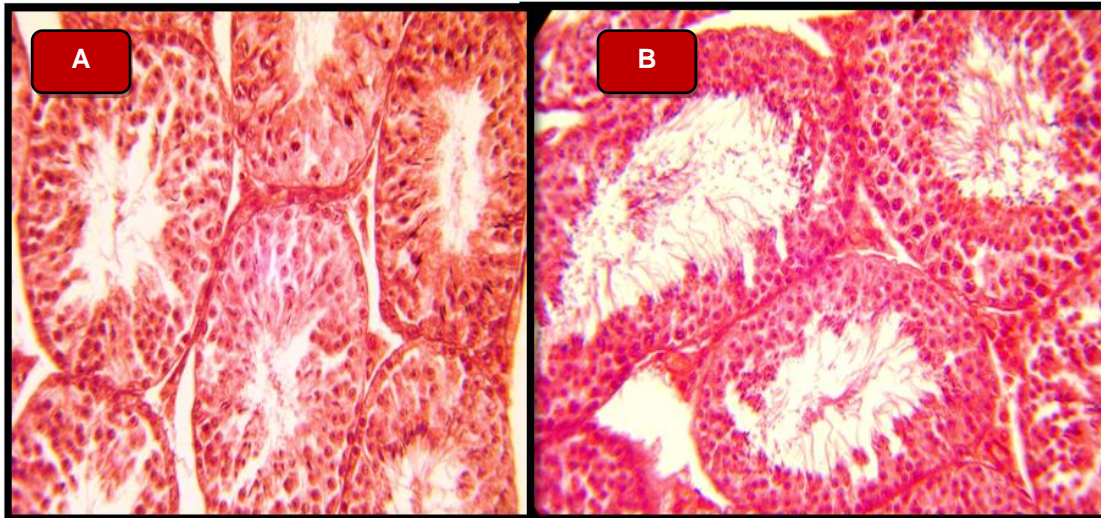
B

*Figura 16. Colonización intraluminal y diferenciación de las células de la MCI, A. Las flechas indica la formación de los minitúbulos en el lumen de los túbulos seminíferos del animal receptor (100X); Sincronización de los minitúbulos con respecto al epitelio seminífero con el receptor: B (400X); C (630X); D (630X).*



*Figura 17. Colonización intraluminal y diferenciación de las células de la MCI (630X). (MB: estructura similar a membrana basal, S: célula de Sertoli, E: Espermatocito primario, ES: espermátide.*





*Figura 18. Corte Histológico de testículo control. A (250X) y B (400X)*

## **V. DISCUSIÓN**

El modelo ratón nos brinda una alternativa atractiva para el estudio de la diferenciación *in vivo* de las células de la MCI y para poder determinar el potencial de la terapia celular en humanos basada en el uso de las células madre pluripotentes. En el presente trabajo los resultados sugieren que las células de la MCI tienen la capacidad de diferenciarse *in vivo* a células de la línea germinal, presentándose en forma de minitúbulos, destacando la presencia de una estructura similar a una membrana basal.

Al aplicar la ciclofosfamida a una concentración de 220mg/kg de peso corporal, obtuvimos una reducción en el diámetro de la mayoría de los túbulos y en el número de células espermato goniales con respecto al control, siendo estos resultados similares a los obtenidos por Elangovan *et al.* (2006), cuando inyectó el mismo fármaco a 200 mg/kg en ratones, demostrando así, que el tratamiento de CP en ratones machos altera la espermatogénesis y reduce la fertilidad. Esta inhibición de la espermatogénesis es debido

a los bajos niveles de gonadotropinas y testosterona en el plasma sanguíneo, tal como lo determinaron Means (1975), Chowdhury (1979) en ratas y Elangovan *et al.* (2006) en ratones.

La utilización de la técnica de inmunocirugía ha demostrado ser un método muy efectivo para la obtención de células de la MCI o células madre pluripotentes, fue utilizada por primera vez por Solter y Knowles (1975) en ratones y luego por Thomson *et al.* (1995) en primates y Thomson *et al.* (1998) en humanos, hoy en día, esta técnica ha demostrado ser excelente para estudiar la biología del desarrollo de muchas especies, así como nuevas posibilidades para el trasplante en medicina debido a que las CMP tienen el potencial para poder originar a todos los tipos de células adultas, así cualquier enfermedad que se presente debido al mal funcionamiento de tipos de células específicas pueden ser potencialmente tratables a través del trasplante de células diferenciadas a partir de las CMP obtenidas mediante este método, en nuestro caso nos permitió la obtención de una gran cantidad de células donadoras viables en un corto tiempo, las cuales fueron transplantadas a nivel de la rete testis de los ratones.

Según Ogawa *et al.* (1997), de los diferentes tipos de procedimientos de inyección de células donadoras dentro de los túbulos seminíferos de un receptor, la técnica de inyección a nivel de rete testis ha demostrado ser un método sencillo, eficiente y reproducible. Utilizando esta técnica y células de la MCI, nosotros obtuvimos resultados en los que se observó la presencia de una colonización intraluminal en forma de minitúbulos con presencia de células espermatozógenas siendo estos resultados similares a los hallados por Jiang y Short (1995) en ratas y Guzmán (2005) en ratones, utilizando CGPs. Los minitúbulos sólo han sido observados en los testículos que recibieron el trasplante de células donadoras, más no en los testículos controles en los que sólo se



les inyectó medio HTF con HEPES más el colorante vital, por tanto este nuevo epitelio seminífero hallado no sería un efecto ocasionado por el tratamiento previo con CP ni un artefacto producido por el procedimiento de la inyección, esto fue observado también por Jiang y Short (1995) y Guzmán (2005), quienes obtuvieron en sus trabajos resultados congruentes a los nuestros utilizando el fármaco Busulfán en lugar de CP.

La diferenciación obtenida *in vivo* de las células de la MCI, se debe a que éstas presentan un “estado de memoria” para su diferenciación, que se puede observar desde las etapas de divisiones tempranas cuando el primer blastómero dividido se encuentra destinado a formar predominantemente la estructura embrionaria, tal como lo demostró Piotrowska *et al.* (2001), además algunas de estas CMP están destinadas a ser parte de los túbulos seminíferos como células de Sertoli, es por ello que podemos encontrar a estas células dentro de los minitúbulos (Figura 18). Por otro lado, las CMP y las CGP comparten un gran número de marcadores moleculares similares y si se aplican estímulos apropiados puede diferenciarse de CMP a CGP *in vitro*, tal como explican Geijsen *et al.* (2004); Hubner *et al.* (2003) y Toyooka *et al.* (2003), e inclusive las CMP pueden llegar a formar gametos masculinos capaces de fecundar y desarrollar un individuo tal como lo demostró Nayernia *et al.* (2006) en ratones. En nuestro estudio las células de Sertoli pueden sintetizar estímulos adecuados como el ácido retinoico (AR), tal como lo determinó Cavazzini *et al.* (1996) en ratas, haciendo posible la activación del gen *Stra8* para que pueda iniciarse la diferenciación de las CMP (Oulad-Abdelghani *et al.*, 2006), bajo este mecanismo nuestras células transplantadas pueden diferenciarse en CGPs y estas a su vez en CMG *in vivo*.

Otro de los factores importantes y necesarios para que pueda desarrollarse la espermatogénesis es la existencia de una interacción entre las células de Sertoli y las

CMG, la cual hace posible la activación de estas últimas para iniciar la espermatogénesis tal como lo comprobaron Rossi *et al.* (1993); Ogawa *et al.* (2000) y Kanatsu-Shinohara *et al.* (2005) en ratones. En el presente trabajo, la presencia de minitúbulos nos sugiere que ha existido una diferenciación de la MCI, algunas de estas, a células de Sertoli y otras a CMG lo cual ha hecho posible una interacción, activación y desarrollo de una espermatogénesis intraluminal.

Los resultados muestran que el ciclo espermatogénico desarrollado en los minitúbulos a partir de la diferenciación de células de la MCI, se encuentra en sincronización con los túbulos hospederos, siendo este resultado concordante con lo obtenido por Jiang y Short (1995) y Guzmán (2005) que utilizaron en sus transplantes a las CGPs, es así que se puede sugerir que el microambiente tubular se encuentra regulado tanto por el epitelio seminífero tubular e intraluminal. Por otro lado no se ha observado la presencia de células de Leydig en asociación con el epitelio donador (minitúbulos), tal como lo reportó Jiang y Short en el año 1995 y esto debido a que estas células no pueden sobrevivir en este microambiente.

Bajo las condiciones de la investigación, se encontró una frecuencia de 2% de desarrollo minitúbulos, por ratón receptor ya que las células donadoras presentan poca probabilidad de colonizar e interactuar, esto debido a que se ha utilizado una baja concentración de células, estos resultados son discordantes a los de Jiang y Short (1995) y Guzmán (2005) que encontraron 5% y 1% de minitúbulos respectivamente en sus trabajos utilizando una concentración de células  $10^6$  veces mayor. Otro factor que determinamos que puede ser causante de esta baja concentración de minitúbulos se debe a que CP no elimina completamente las células germinales, sólo las disminuye drásticamente, siendo este resultado congruente a los de Elangovan *et al.* (2006); a pesar de ello, si comparamos la

concentración de la suspensión celular inyectada en la rete testis y el porcentaje de minitúbulos obtenidos en el trabajo podemos mencionar que existe una mayor probabilidad de recuperación del epitelio seminífero cuando se utilizan células indiferenciadas como la MCI.

Cabe resaltar que en los trabajos publicados sobre trasplante de células madre no se ha hallado ninguna evidencia en donde reporte que se haya utilizado células de la MCI *in vivo* para poder restaurar la espermatogénesis en los túbulos seminíferos en ratones que presentan disminuidos su fertilidad por acción de la CP, de esta manera podemos señalar que la inyección de las células pluripotentes de la MCI ha demostrado ser una técnica contundente para el estudio de la espermatogénesis en todos sus niveles demostrando que puede ser utilizada en las técnicas de reproducción asistida en humanos, para la recuperación del epitelio seminífero en varones que presentan una patología testicular y como un gran potencial en las terapias del futuro.

## **VI. CONCLUSIONES**

- Las células pluripotentes de la MCI de la cepa Swiss Rockefeller transplantadas a través de la rete testis son capaces de diferenciarse en células de la línea germinal y colonizar el lumen de los túbulos de animales receptores en ratones de la cepa C57BL.
- Las células diferenciadas a partir de la MCI son capaces de interactuar y desarrollar una espermatogénesis xenogénica en los minitúbulos formados en el ratón hospedero.
- El ciclo espermatogénico de los minitúbulos se encuentra en sincronización con respecto al ciclo espermatogénico del ratón hospedero.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANCELIN K, LANGE UC, HAJKOVA P. Blimp1 associates with Prmt5 and directs histone arginine methylation in mouse germ cells. *Nature Cell Biology*. 2006, vol. 8, p. 623–630.

ARIAS ME y FELMER R. Biología de las células madre embrionarias (ES cells) en distintas especies: potenciales aplicaciones en biomedicina. *Arch. Med. Vet.* 2009, vol. 41, nº.3, p. 185-195.

BOHELER KR, CZYS J, TWEEDIE D, YANG HT, ANISIMOV SV, WOBUS AM. Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into cardiomyocytes. *Circ Res*. 2002, vol. 91, p. 189 – 201.

BORTVIN A, GOODHEART M, LIAO M, PAGE D. Dppa3/Pgc7/stella is a maternal factor and is not required for germ cell specification in mice. *BMC Dev Biol.* 2004, vol. 4, p. 2.

BOWLES J, KNIGHT D, SMITH C. Retinoid signaling determines germ cell fate in mice. *Science.* 2006, vol. 312, p. 596–600.

BRINKWORTH M, NIESCHLAG E. Association of cyclophosphamide-induced male-mediated, fetal abnormalities with reduced paternal germ-cell apoptosis. *Mutat Res.* 2000, vol. 447, n<sup>o</sup>. 2, p. 149-54.

BRINSTER R, AVARBOCK M. Germ-line transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA.* 1994, vol. 91, p. 11303-11307.

BRINSTER R, ZIMMERMANN J. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proceeding of the National Academia of Science. USA.* 1994, vol. 91, p. 11298 – 11302.

BYRNE J, PEDERSEN D, CLEPPER L, NELSON M, SANGER W, GOKHALE S, WOLF D, MITALIPOV S. Producing primate embryonic stem cells by somatic cell nuclear transfer. *Nature.* 2007, vol. 450, p. 497-502.

CAVAZZINI D, GALDIERI M, OTTONELLO S. Retinoic acid synthesis in the somatic cells of rat seminiferous tubules. *Biochim Biophys Acta.* 1996 vol. 1313, p. 139–145.

CHAMBERS I, SILVA J, COLBY D, NICHOLS J, NIJMEIJER B. Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development. *Nature*. 2007, vol. 450, p.1230–34.

CHARAK B, GUPTA R, MANDREKAR P, SHETH NA, BANAVALI SD, SAIKIA TK, GOPAL R, DINSHAW KA, ADVANI SH. Testicular dysfunction after cyclophosphamide-vincristine-procarbazine-prednisolone chemotherapy for advanced Hodgkin's disease. A long-term follow-up study. *Cancer*. 1990, vol. 65, p. 1903–1906.

CHIQUELINE A. The identification, origin, and migration of the primordial germ cells in the mouse embryo. *Anat. Rec*. 1954, vol. 118, p. 135 -146.

CHOWDHURY A. Effect of pharmacological agents on male reproduction. *Adv Contracept Deliv Syst*. 1987, vol. 3, n<sup>o</sup>4, p. 347-52.

CHOWDHURY A. Dependence of testicular germ cells on hormone. A quantitative study in hypophysectomized testosterone treated rats. *J. Endocrinol*. 1979, vol. 20, p. 911.

CIBELLI J, STICE S, GOLUEKE P, KANE J, JERRY J, BLACKWELL C, PONCE DE LEON F, ROBL J. Transgenic bovine chimeric offspring produced from somatic cell-derived stem-like cells. *Nat Biotechnol*. 1998, vol. 16, p. 642-646.

CIBELLI J, GRANT K, CHAPMAN K, CUNNIFF K, WORST T, GREEN HL, WALKER SJ, GUTIN, L VILNER P, TABAR V, DOMINKO T, KANE J, WETTSTEIN P, LANZA R, STUDER L, VRANA K, WEST M. Parthenogenetic stem cells in nonhuman primates. *Science*. 2002, vol. 295, p. 819.

CLARK A, RODRIGUEZ R, BODNAR M, ABEYTA M, TUREK P, FIRPO M, REIJO RA. The human STELLAR, NANOG and GDF3 genes are expressed in pluripotent cells and map to chromosome 12p a hotspot for teratocarcinoma. *Stem Cells*.2004. vol. 22, p. 169–179.

CROOK, TR, SOUHAMI, RL, MCLEAN, AE. Cytotoxicity, DNA cross-linking, and single strand breaks induced by activated cyclophosphamide and acrolein in human leukemia cells. *Cancer Res*. 1986, vol. 46, p. 5029–5034.

DAS S, BONAGUIDI M, MURO K, KESSLER JA. Generation of embryonic stem cells: limitations of and alternatives to inner cell mass harvest. *Neurosurg Focus* 2008, vol.24, p. 1-12.

DE ROOIJ, D. Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells. *Reproduction*. 2001, vol. 121, p.347–354.

DOETSCHMAN T, WILLIAMS P, MAEDA N. Establishment of hamster blastocyst-derived embryonic stem (ES) cells. *Dev Biol*. 1988, vol. 127, p. 224 - 227.

DOLLERY C. Therapeutic Drugs. *Churchill Livingstone, Edinburg*. 1999, p. 349–354

DONOVAN P, RESNICK J, CHENG L, LOCK L. Towards the use of primordial germ cells for germline modification. In: Transgenic animals generation and use, Ed Houdebine L.M. Harwood academic publishers. 1997.



DONOVAN P. The germ cell: The mother of all stem cells. *Int. J. Dev. Biol.* 1998, vol. 42, p.1043-50.

ELANGO VAN N, CHIOU TJ, TZENG WF, CHU ST. Cyclophosphamide treatment causes impairment of sperm and its fertilizing ability in mice. *Toxicology*. 2006 vol. 222, p. 60 - 70.

EVANS M, KAUFMAN M. Establishment in culture of pluripotential cells from Mouse embryos. *Nature*. 1981, vol. 292, p. 154-156.

EVANS M, NOTARIANNI E, LAURIE S, MOOR R. Derivation and preliminary characterization of pluripotent cell lines from porcine and bovine blastocysts. *Theriogenology*. 1990, vol. 33, p. 125 – 128

EZEKIEL U, MUTHUCHAMYO M, RYERSE J, HEUERTZ R. Single embryoid body formation in a multi-well plate. *Electron J Biotechnology*. 2007, vol. 10, p. 328-335.

FREEMAN B. The active migration of germ cells in the embryos of mice and men is a myth. *Reproduction*. 2003, vol.125, p. 635–643.

GEIJSEN N, HOROSCHAK M, KIM K. Derivation of embryonic germ cells and male gametes from embryonic stem cells. *Nature*. 2004, vol. 427, p. 148–154.

GINSBURG M, SNOW MH, MCLAREN A. Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. *Development*. 1990, vol. 110, p. 521–528.

GODIN I, WYLIE C, HEASMAN J. Genital ridges exert long range effects on mouse primordial germ cell numbers and direction of migration in culture. *Development*. 1990, vol. 108, p. 357–363.

GRAVES K, MOREADITH R. Derivation and characterization of putative pluripotential embryonic stem cells from pre implantation rabbit embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 1993, vol. 36, p. 424-433.

GUZMÁN MASÍAS, Luis Alberto."Colonización intraluminal de los túbulos seminíferos de ratones post-transplante intraespecífico de células germinales primordiales". Asesor: José Pino. Tesis Profesional UNMSM, E.A.P Ciencias Biológicas, Lima, 2005.

HANDYSIDE A. Time of commitment of inside cells isolated from preimplantation mouse embryos. *J Embryol Exp Zool.* 1978, vol. 45, p. 37–53.

HAYES B, FAGERLIE SR, RAMAKRISHNAN A, BARAN S, HARKEY M, GRAF L, BAR M, BENDORAITE A, TEWARI M, TOROK-STORB B. Derivation, characterization, and in vitro differentiation of canine embryonic stem cells. *Stem Cells*. 2008, vol. 2, p. 465-473.

HEMMINKI K, KALLAMA S. Reactions of nitrogen mustards with DNA. *IARC Sci. Publ.* 1986, vol. 78, p. 55 – 70.

HOGAN B, BEDDINGTON R, CONSTANTINI F, LACY E. Manipulating the embryo mouse. *Cold Spring Laboratory Press*. 1994. New York. p. 19 -109.

HOOPER M. Embryonal stem cells: introducing planned changes into the germline. *Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland*. 1992.

HOORWEG – NIJMAN JJ, DELEMARRE-VANDE-WALL HA, DEWALL FC, BEHRENDT H. Cyclophosphamide-induced disturbance of gonadotropin secretion manifesting testicular damage. *Acta Endocrinol*. 1992, vol. 126, p. 143–148.

HU A, CAI J, ZHENG Q, HE X, PAN Y, LI L. Hepatic differentiation from embryonic stem cells in vitro. *Chin Med J*. 2003, vol. 116, p. 1893-1897.

HUBNER K, FUHRMANN G, CHRISTENSON LK. Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells. *Science*. 2003, vol.300, p. 1251–1256.

IANNACCONE P, TABOM G, GARTEN R, CAPLICE M, BRENIN O. Pluripotent embryonic stem cells from the rat are capable of producing chimeras. *Dev. Bio*. 1994, vol. 163, p. 288-292.

JAENISCH R. DNA methylation and imprinting: why bother? *TIG*.1997, vol.13, p. 323–329.

JIANG F, SHORT R. Male germ cell transplantation in rat: apparent synchronization of spermatogenesis between host and seminiferous epithelia. *International Journal of Andrology*. 1995, vol. 18, p. 326 – 330.

JOHNSON A, WILLIAMS E. *Stem Cell Research*. 2006, *CRS Report for Congress*.

JOHNSON M, ZIOMEK C. The foundation of two distinct cell lineages within the mouse morula. *Cell*. 1981, vol. 24, p. 71–80.

KANATSU-SHINOHARA M, MIKI H, INOUE, K; OGONUKI N, TOYOKUNI S, OGURA A, SHINOHARA T. Germline niche transplantation restores fertility in infertile mice. *Hum Reprod*. 2005, n°. 9, p. 2376-2382

KELLER G. In vitro differentiation of embryonic stem cells. *Cell Biol*.1995, vol. 7, p. 862-869.

KELLER G, M KENNEDY, T PAPAYANNOPOULOU, M WILES. Hematopoietic commitment during embryonic stem cell differentiation in culture. *Mol Cell Biol*. 1993, vol. 13, p. 473-486.

KENNEY L, LAUFER M, GRANT F, GRIER H, DILLER L. High risk of infertility and long term gonadal damage in males treated with high dose cyclophosphamide for sarcoma during childhood. *Cancer*. 2001, vol. 91, p. 613–621.

KOUBOVA J, MENKE DB, ZHOU Q. Retinoic acid regulates sex-specific timing of meiotic initiation in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006, vol. 103, p. 2474–2479.

LACHAM-KAPLAN O, CHY H, TROUNSON A. Testicular cell conditioned medium supports differentiation of embryonic stem cells into ovarian structures containing oocytes. *Stem Cells*. 2006, vol. 24, p. 266–273.

LAWSON K, DUNN N, ROELEN B, ZEINSTRA L, DAVIS A, WRIGHT , KORVING J, HOGAN BL. Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. *Genes Dev.* 1999, vol. 13, p. 424 – 436.

LAHDETIE J. Micronuclei induced during meiosis by ethyl methanesulfonate, cyclophosphamide and dimethylbenzanthracene in male rats. *Mutat Res.* 1983, vol. 120: 257–260.

LAHDETIE J. Induction and survival of micronuclei in rat spermatids. Comparison of two meiotic micronucleus techniques using cyclophosphamide. *Mutat Res.* 1988, vol. 203, p. 47 – 53.

LEAHY A, XIONG J, KUHNERT F, STUHLMANN H. Use of developmental marker genes to define temporal and spatial patterns of differentiation during embryoid body formation. *J Exp Zool.* 1999, vol. 284, p. 67-81.

LIERSCH R, NAY F, LU L, DETMAR M. Induction of lymphatic endothelial cell differentiation in embryoid bodies. *Blood.* 2006, vol. 107, p.1214-1216.

LIU M, XIONG Y, CAI J, PAN Y, MENG F, LI L. Directed differentiation of Balb/C mouse embryonic stem cells into pancreatic islet-like cell clusters in vitro: observation by atomic force microscope. *Di Yi Jun Yi Da Xue Bao.* 2005, vol. 25, p. 377-379.

LOEFFER M, POTTERN CS. Stem cells and cellular pedigree conceptual introduction. In: CS Potten (Ed), *Stem Cells* 1997. New York: Acad Press; p. 1-27.

LU AND LIN R. TSH stimulates adipogenesis in mouse embryonic stem cells. *J. Endocrinol.* 2008, vol. 196, n<sup>o</sup>. 1, p. 159 – 169.

MATSUI H, MITSUMORI K, YASUHARA K, ONODERA H, SHIMO T, TAKAHASHI M. Morphological evaluation of cyclophosphamide testicular toxicity in rats using quantitative morphometry of spermatogenic cycle stages. *J. Toxicol. Sci.* 1995, vol. 20, p. 407 – 414.

MCLAREN A. Meiosis and differentiation of mouse germ cells. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 1984, 38, p. 7–23.

MCLAREN A. Primordial germ cells in the mouse. *Developmental Biology.* 2003, vol. 262, p. 1–15.

MCLAREN A, LAWSON K. How is the mouse germ-cell lineage established? *Differentiation.* 2005, vol. 73, p. 435–437.

MAI Q, YU Y, LI T, WANG L, CHEN MJ, HUANG SZ, ZHOU C, ZHOU Q. Derivation of human embryonic stem cell lines from parthenogenetic blastocysts. *Cell Res.* 2007, vol. 12, p. 1008-1019.

MARTIN G. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proceeding of the National Academic of Science. USA.* 1981, vol. 78, p. 7634-7638.

MEANS A. Biochemical effect of follicle stimulating hormone on the testis. *Handbook Physiol.* 1975, p. 203–217.

MISE N, FUCHIKAMI T, SUGIMOTO M, KOBAYAKAWA S, IKE F. Differences and similarities in the developmental status of embryo-derived stem cells and primordial germ cells revealed by global expression profiling. *Genes Cells*. 2008, vol. 13, p. 863–877.

NAYERNIA K, NOLTE J, MICHELMANN HW, LEE JH, RATHSACK K, DRUSENHEIMER N, DEV A, WULF G, EHRMANN IE, ELLIOTT DJ, OKPANYI V, ZECHNER U, HAAF T, MEINHARDT A, ENGEL W. In vitro-differentiated embryonic stem cells give rise to male gametes that can generate offspring mice. *Dev Cell*. 2006, vol. 11, p. 125-132.

NAYERNIA K, HO LEE J, ENGEL W, NOLTE J, DRUSENHEIMER N, RATHSACK N, DEV A, WULF G, EHRMANN I, ELLIOTT D, ZECHNER U, HAAF T, MEINHARDT A, MICHELMANN H, HASENFUSS G, GUAN K. From stem cells to germ cells and from germ cells to stem cells. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*. 2007, vol. 5, n<sup>o</sup>.2. p. 41-44.

NEWTON S, OBLASCHUK, MILLETE C. N-Cadherin mediates Sertoli cell- spermatogenic cell adhesion. *Dev. Dynam*. 1993, vol. 197, 1 – 13.

NG S, DAVIS R, AZZOLA L, STANLEY E, ELEFANTY A. Forced aggregation of defined numbers of human embryonic stem cells into embryoid bodies fosters robust, reproducible hematopoietic differentiation. *Cell Prolif*. 2005, vol. 37, p. 23-34.

OHINATA Y, PAYER B, O'CARROLL D, ANCELIN K, ONO Y, SANO M, BARTON SC, OBUKHANYCH T, NUSSENZWEIG M, TARAKHOVSKY A. Blimp1 is a critical determinant of the germ cell lineage in mice. *Nature*. 2005. Vol. 436, p. 207–213.

OHKUBO Y, SHIRAYOSHI Y, NAKATSUJI N. Autonomous regulation of proliferation and growth arrest in mouse primordial germ cells studied by mixed and clonal cultures. *Exp. Cell Res.* 1996, vol. 222, p. 291–297.

OGAWA T, ARÉCHAGA J, AVARBOCK M, BRINSTER R. Transplantation of testis germinal cells into mouse seminiferous tubules. *Int.J.Dev.Biol.* 1997, vol.41, p. 111- 122

OGAWA T, DOBRINSKI I, AVARBOCK M, BRINSTER R. Transplantation of male germ line stem cells restores fertility in infertile mice. *Nat Med.* 2000, vol. 6, p. 29–34

O'SHEA KS. Self-renewal vs. Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells. *Biol. Reprod.* 2004, vol. 71, p. 1755-1765

OULAD-ABDELGHANI M, BOUILLET P, DECIMO D, GANSMULLER A, HEYBERGER S, DOLLE P, BRONNER S, LUTZ Y, CHAMBON P. Characterization of a premeiotic germ cell-specific cytoplasmic protein encoded by Stra8, a novel retinoic acid-responsive gene. *J Cell Biol.* 1996, vol. 135, p. 469 – 477.

PAIN B, CLARK M, SHEN M, NAKAZAWA H, SAKURAI M, SAMARUT J, ETCHES R. Long-term in vitro culture and characterization of avian embryonic stem cells with multiple morphogenetic potentialities. *Development.* 1996, vol. 122, p. 2339-2348.

PIOTROWSKA K, WIANNY F, PEDERSEN RA, ZERNICKA-GOETZ M. Blastomeres arising from the first cleavage division have distinguishable fates in normal mouse development. *Development.* 2001, vol.128, p. 3739–3748.



PRATT S, SCULLY N, SHUR B. Cell surface  $\beta$ -1, 4-galactosyltransferase on primary spermatocytes facilitates their initial adhesion to Sertoli cells in vitro. *Biol. Reprod.* 1993, vol. 49, p. 470 – 482.

QING T, SHI Y, QIN H, YE X, WEI W. Induction of oocyte-like cells from mouse embryonic stem cells by co-culture with ovarian granulosa cells. *Differentiation.* 2007, vol. 75, p. 902–911.

RIPPON H, BISHOP A. Embryonic stem cells. *Cell Prolif.* 2004, vol. 37, p. 23-34.

ROSSI P, DOLCI S, ALBANESI C, GRIMALDI P, RICCA R. Follicle-stimulating hormone induction of steel factor (SLF) mRNA in mouse Sertoli cells and stimulation of DNA synthesis in spermatogonia by soluble SLF. *Dev Biol.* 1993, vol. 155, p. 68–74.

ROSSI P, SETTE C, DOLCI S, GEREMIA R. Role of c-kit in mammalian spermatogenesis. *Journal of Endocrinological Investigation.* 2000, vol. 23, p. 609–615.

SAITO S, SAWAI K, UGAI H, MORIYASU S, MINAMIHASHI A, YAMAMOTO Y, HIRAYAMA H, KAGEYAMA S, PAN J, MURATA T, KOBAYASHI Y, OBATA Y, YOKOYAMA K. Generation of cloned calves and transgenic chimeric embryos from bovine embryonic stem-like cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003, vol. 309, p. 104-113.

SAITOU M, BARTON SC, SURANI MA. A molecular programme for the specification of germ cell fate in mice. *Nature.* 2002, vol. 418, p. 293 - 300.

SANCAR A, LINDSEY-BOLTZ LA, UNSAL-KACMAZ K, LINN S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu. Rev. Biochem.* 2004, vol. 73, p. 39–85.

SATO M, KIMURA T, KUROKAWA K, FUJITA Y, ABE K, MASUHARA M, YASUNAGA T, RYO A, YAMAMOTO M, NAKANO T. Identification of PGC7, a new gene expressed specifically in preimplantation embryos and germ cells. *Mech. Dev.* 2002, vol. 113, p. 91–94.

SHAFFER A, LIN K, KUO T. *Blimp-1* orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program. *Immunity.* 2002, vol. 17, p. 51–62.

SHAPIRO-SHELEF M, LIN K, MCHEYZER-WILLIAMS L. *Blimp-1* is required for the formation of immunoglobulin secreting plasma cells and preplasma memory B cells. *Immunity.* 2003, vol. 19, p. 607–620.

SHETTY G, MEISTRICH M. Hormonal approaches to preservation and restoration of male fertility after cancer treatment. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2005, p. 36–39.

SMITH A. Embryo-derived stem cells: of mice and men. *Rev Cell Dev Biol.* 2001, vol. 17, p. 435–462.

SOLTER D, KNOWLES B. Immunosurgery of mouse blastocyst. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1975, vol. 72, p. 5099-5102.

SOTOMAYOR R, CUMMING R. Induction of translocations by cyclophosphamide in different germ-cell stages of male mice cytological characterization and transmission. *Mutat Res*. 1975, vol. 27, p. 375–388.

STICE S, STRELCHENKO N, KEEFER C, MATTHEWS L. Pluripotent bovine embryonic cell lines direct embryonic development following nuclear transfer. *Biol Reprod*. 1996, vol. 54, p. 100-110.

SUKOYAN M, VATOLIN S, GOLUBITSA A, ZHELEZOVA A, SEMENOVA L, SEROV O. Embryonic stem cells derived from morula, inner cell mass, and blastocysts of mink: comparisons of their pluripotencies. *Mol Reprod Dev*. 1993, vol. 36, p. 148-158.

TAM P, SNOW M. Proliferation and migration of primordial germ cells during compensatory growth in mouse embryos. *J. Embryol. Exp. Morphol*. 1981, vol. 64, p.133–147.

TAM P, ZHOU S X. The allocation of epiblast cells to ectodermal and a germ-line lineage is influenced by the position of the cells in the gastrulating mouse embryo. *Dev. Biol*. 1996, vol. **178**, p. 124-132.

TANAKA S, YAMAGUCHI Y, TSOI B. IFITM/Mil/fragilis family proteins IFITM1 and IFITM3 play distinct roles in mouse primordial germ cell homing and repulsion. *Dev. Cell*. 2005, vol. 9, p. 745–756.

TATES A. Validation studies with the micronucleus test for early spermatids of rats. A tool for detecting clastogenicity of chemicals in differentiating spermatogonia and spermatocytes. *Mutagenesis*. 1992, vol. 7, p. 411 – 419.

THOMSON J, KALISHMAN J, GOLOS T, DERNING M. HARRIS C, BECKER A, HEARN J. Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1995, vol. 92, p. 7844-7848.

THOMSON J, KALISHMAN J, GOLOS T, DURNING M, HARRIS C, HEARN J. Pluripotent cell lines derived from common marmoset (*Callithrix jacchus*) blastocysts. *Biol Reprod*. 1996, vol. 55, p. 254-259.

THOMSON J, ITSKOVITZ-ELDOR J, SHAPIRO S, WAKNITZ M. SWIERGIEL J, MARSHALL V, JONES J. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998, vol. 282, p. 145-1147.

TOYOOKA Y, TSUNEKAWA N, TAKAHASHI Y, MATSUI Y, SATOH M AND NOCE T. Expression and intracellular localization of mouse Vasa homologue protein during germ cell development. *Mechanisms of Development*. 2000, vol. 93, p. 139 – 149.

TOYOOKA Y, TSUNEKAWA N, AKASU R. Embryonic stem cells can form germ cells in vitro. *PNAS*. 2003, vol. 100, p. 11457–11462.

TSANG T, KHOO P, JAMIESON R, ZHOU S, ANG S, BEHRINGER R, TAM P. The allocation and differentiation of mouse primordial germ cells. *Int. J. Dev. Biol.* 2001, vol. 45, p. 549-55.

TURNER C, MACK D, DAVIS M. Blimp-1, a novel zinc finger-containing protein that can drive the maturation of B lymphocytes into immunoglobulin-secreting cells. *Cell.* 1994, vol. 77, p. 297–306.

VIGIL P, BUSTOS-OBREGÓN E. Alkylating agents and mouse spermatogenesis: effects of a single dose of cyclophosphamide. *Andrología.* 1985, vol. 17, p. 276-82.

VINCENT S, DUNN N, SCIAMMAS R, CHAPIRO-SHALEF M, DAVIS M, CALAME K, BIKOFF E, ROBERTSON E. The zinc finger transcriptional repressor Blimp1/Prdm1 is dispensable for early axis formation but is required for specification of primordial germ cells in the mouse. *Development.* 2005, vol. 132, p. 1315–1325.

WAKAYAMA T, TABAR V, RODRIGUEZ I, PERRY AC, STUDER L, MOMBAERTS P. Differentiation of embryonic stem cell lines generated from adult somatic cells by nuclear transfer. *Science.* 2001, vol. 292, p. 740-743.

WANG L, DUAN E, SUNG LY, JEONG BS, YANG X, TIAN XC. Generation and characterization of pluripotent stem cells from cloned bovine embryos. *Biol Reprod.* 2005, vol. 73, p. 149-155.

WYLIE CC, SCOTT D, DONOVAN PJ. Primordial germ cell migration. *Developmental Biology.* 1985, vol. 2, p. 433–448.

YABUTA Y, KURIMOTO K, OHINATA Y, SEKI Y, SAITOU M. Gene expression dynamics during germline specification in mice identified by quantitative single cell gene expression profiling. *Biol Reprod.* 2006, vol. 75, p. 705–716.

YING Y, LIU XM, MARBLE A, LAWSON KA, ZHAO GQ. Requirement of Bmp8b for the generation of primordial germ cells in the mouse. *Mol. Endocrinol.* 2000, vol. 14, p. 1053 - 1063.

YU X, JIN G, YIN X, CHO S, JEON J, LEE S, KONG I. Isolation and characterization of embryonic stem-like cells derived from in vivo produced cat blastocysts. *Mol Reprod Dev.* 2008, vol. 75, p. 1426-1432.

ZHAO G, DENG K, LABOSKY P, LIAW L, HOGAN B. The gene encoding bone morphogenetic protein 8B is required for the initiation and maintenance of spermatogenesis in the mouse. *Genes Dev.* 1996, vol. 10, p. 1657 – 1669.

## VIII. ANEXOS

### Anexo 1

Protocolo 1. Inoculaciones de células de bazo de ratón en conejo para la producción de anticuerpos

Día	Volumen de dosis ( $4 \times 10^8$ cel/ml)	Procedimiento
1	----- 0.5 ml	Sangría Pre inmune Inoculación de Células de Bazo

4	0.5 ml -----	Inoculación de Células de Bazo Sangría Parcial 1
8	1.0 ml	Inoculación de células de bazo
12	1.0 ml	Inoculación de células de bazo
15	-----	Sangría Parcial 2

## Anexo 2

### Componentes del fijador BOUIN

Reactivos	Volumen
Alcohol 70° +Ac. Pírico	85 ml
Ac. Acético Glacial	5 ml
Formaldehido	10 ml



### Anexo 3

#### Protocolo 2 Deshidratación, aclarado y parafinado de la muestra

---

PROCESO	TIEMPO
Alcohol de 70 + Carbonato de Sodio	24 horas
Alcohol de 80	30 minutos
Alcohol de 90	30 minutos

---

Alcohol de 96	30 minutos
Alcohol de 100 (1)	30 minutos
Alcohol de 100 (2)	20 minutos
Alcohol-Xilol (3:1)	15 minutos
Alcohol- Xilol (1:1)	10 minutos
Xilol	5 minutos (observación de la muestra)
Paraplast 1	15 minutos
Paraplast 2	10 minutos

#### Anexo 4

##### Protocolo 3. Coloración Hematoxilina + Eosina

PROCESO	TIEMPO
Xilol 1	3 minutos

---

Xilol 2	3 minutos
Alcohol 96	3 minutos
Alcohol 90	3 minutos
Alcohol 80	3 minutos
Alcohol 70	3 minutos
Agua destilada	3 minutos
Hematoxilina	1 minuto
Agua de caño	4 minutos
Eosina	3 minutos
Alcohol 96 (1)	10 Inmersiones
Alcohol 96 (2)	10 Inmersiones
Alcohol 100 (1)	3 minutos
Alcohol 100 (2)	3 minutos
Xilol	3 minutos

---